

**Evaluación de la biocompatibilidad y
eficiencia como sustituto artificial de
soportes de colágeno tipo I asociados con
extractos de caléndula (*Calendula
officinalis*) en heridas cutáneas en un
modelo animal lagomorfo**

Diana Milena Millán Cortes

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades en Microbiología
Bogotá, Colombia
2014

Evaluación de la biocompatibilidad y eficiencia como sustituto artificial de soportes de colágeno tipo I asociados con extractos de caléndula (*Calendula officinalis*) en heridas cutáneas en un modelo animal lagomorfo

Diana Milena Millán Cortes

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Microbiología

Directora:

Marta Raquel Fontanilla Duque. Q.F., Ph. D.

Codirector:

Luis Eduardo Nieto Ramírez. MD., MSc., Cirujano Plástico.

Línea de Investigación:

Biología celular

Grupo de Investigación:

Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades en Microbiología

Bogotá, Colombia

2014

A Dios por la familia que me regalo, a mi esposo Ronald Jiménez, mi hija Samy y Frodo por su amor, paciencia y apoyo en cada etapa de mi vida.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la profesora Marta Fontanilla por su ejemplo, apoyo, cariño, confianza y consejos que nos sirven para crecer académicamente y profesionalmente. Al Dr. Luís Eduardo Nieto y la Dra. Italy Linero por su interés incondicional en el trabajo, su tiempo y la colaboración brindada en los ensayos *in vivo*. Al Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos por su apoyo, sus buenas energías, su colaboración, entusiasmo y amistad. A Ronald Jiménez por su exigencia, amor y apoyo constante. A Edward Suesca por su amistad y tranquilidad, cualidades que nos ayudan a no salirnos de casillas en un momento de estrés. A Rosita Bustos por su amistad y generosidad y a Sergio, Dianita Nieto, Ana Milena, Mae, Adriana, Leo, Julito, Héctor, Gabrielito y las semillitas.

Quiero expresar un agradecimiento enorme a Oswaldo Escobar quién me ayudó en el manejo técnico animal, y a Manuel Alfonso Patarroyo por todos los favores.

También quiero agradecer al patólogo Manuel Laverde por su tiempo y ayuda en el análisis de las histologías. A Diana Rojas por su colaboración con los animales en el bioterio. Al profesor Luis Fernando Ospina por el préstamo de las instalaciones del bioterio sin ningún interés más que la colaboración con nuestro grupo.

Al Posgrado en Microbiología, especialmente a Socorrito por sus consejos, ayuda y cariño con el que nos recibe todo el tiempo, a los profesores del posgrado, a mis amig@s con l@s que cursé esta etapa, lindas y lindos: Astrid, Lina, Dieguito, Caroline, Vane, Lili, Deisy, Moni, Yara y Leidy Viviana.

A mis amigas de siempre Gaby y Consuelito porque sé que siempre estarán allí y puedo contar con ellas.

A Colciencias por su apoyo financiero.

Resumen

En Colombia la incidencia de lesiones que ocasionan pérdida de continuidad de piel y requieren de injertos para su tratamiento, es alta. El tratamiento estándar es el autoinjerto; sin embargo, al obtener tejido propio se genera una nueva lesión que cierra por segunda intención que al cicatrizar puede tener compromisos cosméticos, funcionales y anatómicos. Los sustitutos de piel desarrollados por la ingeniería de tejidos son una alternativa para superar estos inconvenientes, ya que permiten reemplazar el tejido dañado por uno con características similares al perdido; no obstante, estos sustitutos son costosos y no son accesibles a poblaciones con limitaciones socio-económicas. Por lo tanto, el país necesita desarrollar sustitutos de costo moderado que sean efectivos en el tratamiento de heridas. Para esto, nuestro grupo ha desarrollado soportes de colágeno y tejidos artificiales que han demostrado mejorar la cicatrización. La inclusión de células en el soporte para desarrollar tejido artificial optimiza el tratamiento pero eleva su costo. Una alternativa sencilla y más económica es usar soportes de colágeno sin células, asociados con extractos vegetales empleados en la tradición popular para promover la cicatrización. Ya que, el extracto de flores de caléndula es aceptado por el INVIMA como antiinflamatorio y cicatrizante de uso tópico, este trabajo planteó evaluar la biocompatibilidad y eficacia de soportes de colágeno tipo I asociados con un extracto hidroglicólico de flores de caléndula mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, en heridas cutáneas de espesor total en un modelo animal lagomorfo. Los resultados obtenidos indican que el soporte asociado al extracto no es citotóxico, sin embargo, en el ensayo *in vivo* se evidenció que el extracto afecta la integración y velocidad de degradación de soporte en el lecho de la herida, impidiendo la migración celular y el recambio del soporte. El conjunto de datos obtenidos indican que el sistema soporte - extracto desarrollado no es biocompatible.

Palabras clave: Soporte de colágeno, extracto de caléndula, heridas cutáneas, citotoxicidad, biocompatibilidad.

Abstract

Colombia has high incidence of injuries that result in loss of continuity of skin, autografts are required for these treatment. However, get own tissue of donor site can be generate injury and scar healing by secondary intention can cause cosmetic deformity, functional impairment and anatomical damage; additionally, in large wounds, there are limitations on the amount of donor tissue. Skin substitutes developed from tissue engineering are an alternative to overcome these drawbacks, allowing replace the damaged tissue by one with similar characteristics of normal tissue. However, these substitutes are expensive and are not accessible to people with socio-economic constraints. Therefore, our country has the need to develop substitutes of moderate cost and effective in the treatment of wounds. For this, our group has developed collagen scaffolds and artificial tissues that have been shown improve healing. The inclusion of cells in scaffolds to develop artificial tissue improves healing but increases its costs. An easy and economical alternative treatment is use collagen scaffold without cells associated with herbs extracts used from popular traditions to induce wound healing. Since the marigold flowers extract is accepted by INVIMA as anti-inflammatory and topical used for healing, this work proposed evaluate the biocompatibility and efficiency by in vitro and in vivo assays of collagen scaffolds type I associated with marigold flowers extract in full-thickness skin wounds. The results showed that collagen scaffold associated with marigold flower extract wasn't cytotoxic, however the in vivo assay showed that the marigold extract affects the collagen scaffold integration in the wound bed and its degradation rate, avoiding the cell migration and replacement of scaffold for a new extracellular matrix synthesized for the cells. This work concluded that scaffold- marigold extract system wasn't biocompatible.

Keywords: Collagen scaffold, marigold flower extract, full-thickness skin wounds, cytotoxicity, biocompatibility

Contenido

Pág.

Resumen.....	5
Abstract.....	6
1. Introducción.....	11
2. Marco teórico.....	13
2.1 La piel y sus funciones.....	13
2.2 Proceso de reparación de heridas en piel.....	15
2.2.1 Inflamación.....	16
2.2.2 Formación de tejido de granulación.....	16
2.2.3 Remodelamiento.....	17
2.3 Tipos y cierre de heridas.....	17
2.3.1 Tipos de heridas.....	18
2.3.2 Cierres de las heridas por primera y segunda intención.....	18
2.4 Ingeniería de tejidos en el tratamiento de la pérdida de tejidos.....	19
2.5 Uso del colágeno en ingeniería de tejidos.....	19
2.6 Biocompatibilidad de los soportes empleados en ingeniería de tejidos.....	20
2.7 Sustitutos artificiales de piel.....	21
2.8 Cierre de heridas empleando extractos de <i>Calendula officinalis</i>	22
3. Objetivos.....	24
3.1 Objetivo general.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4. Materiales y Métodos.....	25
4.1 Consideraciones éticas.....	25
4.2 Extracto de caléndula.....	25
4.3 Cultivo de fibroblastos L929.....	25
4.4 Cultivo de fibroblastos primarios de piel de conejo.....	26
4.5 Obtención de plasma de conejo.....	26

4.6	Cuantificación de proteína total del plasma de conejo	27
4.7	Metodología objetivo específico 1 (Establecer la dosis del extracto de caléndula que se necesita para cargar los soportes de colágeno tipo I).	27
4.7.1	Evaluación de la citotoxicidad celular inducida por el extracto de caléndula (determinación de dosis de carga)	27
4.8	Metodología objetivo específico 2 (Evaluar <i>in vitro</i> la citotoxicidad de soportes de colágeno que contienen extracto de caléndula).	28
4.8.1	Asociación del soporte con el extracto de caléndula	28
4.8.2	Evaluación de la citotoxicidad celular inducida por el soporte de colágeno cargado con extracto de caléndula.....	28
4.9	Metodología objetivo específico 3 (Evaluar el desempeño de soportes de colágeno que contienen extracto de caléndula como implante en un modelo animal lagomorfo de heridas cutáneas de espesor total).	29
4.9.1	Diseño experimental animal	29
4.9.2	Procedimiento quirúrgico y posicionamiento de los soportes de colágeno con y sin extracto de caléndula.	29
4.9.3	Seguimiento clínico de las heridas	31
4.9.4	Análisis histomorfométrico del tejido.....	31
4.9.5	Análisis estadístico.....	32
5.	Resultados.....	33
5.1	Resultado objetivo específico 1 (Establecer la dosis del extracto de caléndula que se necesita para cargar los soportes de colágeno tipo I):	33
5.1.1	Obtención de fibroblastos primarios de piel de conejo	33
5.1.2	Citotoxicidad celular inducida por el extracto de caléndula	33
5.2	Resultado objetivo específico 2 (Evaluar <i>in vitro</i> la citotoxicidad de soportes de colágeno que contienen extracto de caléndula).	36
5.3	Resultado objetivo específico 3 (Evaluar el desempeño de soportes de colágeno que contienen extracto de caléndula como implante en un modelo animal lagomorfo de heridas cutáneas de espesor total).	38
5.3.1	Seguimiento clínico de las heridas	38
5.3.2	Análisis histomorfométrico del tejido.....	40
5.3.3	Número de capas del epitelio	40
5.3.4	Grosor del tejido conectivo.....	42
5.3.5	Disposición de las fibras de colágeno	44
5.3.6	Vascularización e inflamación	46
6.	Discusión.....	49

7.	Conclusiones	53
8.	Recomendaciones.....	54
9.	Bibliografía	55

Lista de figuras

Figura 2-1. Estratos de la epidermis.....	14
Figura 2-2. Etapas del cierre de heridas y formación de cicatrización.	15
Figura 4-1. Distribución de unidades experimentales y asignación de tratamientos a cada unidad experimental.	29
Figura 4-2. Posicionamiento de los soportes en heridas de espesor total.	30
Figura 5-1. Fibroblastos de piel de conejo obtenidos a partir de la técnica de explantes..	33
Figura 5-2. Porcentaje de viabilidad celular de células L929 (A) y fibroblastos primarios de piel de conejo (B) incubados con diferentes diluciones de extracto de caléndula.	34
Figura 5-3. Reactividad biológica en la línea celular L929 (A). Reactividad biológica de fibroblastos de piel de conejo con diferentes diluciones del extracto de caléndula (B).	35
Figura 5-4. Porcentaje de viabilidad de células L929 (A) y fibroblastos primarios de piel de conejo (B) inducido por el soporte asociado al extracto.....	36
Figura 5-5. Evaluación de la reactividad biológica en fibroblastos L929 y fibroblastos primarios de piel de conejo frente al soporte de colágeno cargado con extracto hidroglicólico de caléndula.....	37
Figura 5-6. Adhesión y viabilidad de células primarias en los soportes de colágeno cargados con extracto hidroglicólico de caléndula luego de 7 días de cultivo.	37
Figura 5-7. Desbridamiento de la herida tratada con soporte de colágeno y soporte de colágeno asociado a extracto de caléndula.	39
Figura 5-8. Imágenes clínicas representativas de las heridas después de los tratamientos en cada grupo.....	40
Figura 5-9. Corte histológico teñido con H&E del tejido obtenido después de los tratamientos. Capas de epitelio obtenidas al final del cierre (B).	41
Figura 5-10. Relación de número de capas de epitelio obtenidas después del cierre de las heridas en cada grupo... ..	42
Figura 5-11. Cortes histológicos y tinción con H&E del tejido obtenido después del cierre.....	43
Figura 5-12. Relación de grosor del tejido conectivo después del tratamiento en cada grupo.....	44
Figura 5-13. Disposición de las fibras de colágeno del tejido obtenido después de los tratamientos en cada grupo y en la zona sana adyacente.	45
Figura 5-14. Agrupación de las fibras encontradas de acuerdo a las características observadas en los análisis histológicos de las heridas tratadas y el control.	46
Figura 5-15. Relación de número de células inflamatorias después del cierre en cada grupo.	47
Figura 5-16. Relación de número de vasos sanguíneos después del cierre de la herida en cada grupo..	48

1. Introducción

Las lesiones en piel se pueden presentar por traumas mecánicos, trastornos genéticos e intervenciones quirúrgicas, etc. En Colombia, existen registros de su incidencia: 3.198 casos de quemaduras reportados por el Ministerio de Protección Social desde el año 2002 hasta la fecha; 1.273 casos de cáncer de piel melanoma y no melanoma reportados por el Instituto Nacional de Cancerología en el 2010; 40.785 heridos por accidentes de tránsito en el 2011 reportados por el Ministerio de Transporte, además de otros tipos de traumas [1-3].

Los adultos mayores, pacientes con diabetes, postrados en cama, con enfermedades vasculares o tratados con inmunosupresores, quimioterapéuticos y radioterapia sufren de anormalidades en la cicatrización que pueden conducir a que una herida se vuelva crónica. Estas heridas afectan su desempeño, su estado anímico, su interrelación con otras personas y demandan procedimientos costosos y en algunas ocasiones prolongados que constituyen una carga económica para el paciente y el sistema de salud. El tratamiento estándar es el autoinjerto, sin embargo, está limitado por el tejido propio disponible para injerto. Una aproximación que cada vez toma más fuerza en el mundo es elaborar sustitutos de piel que sirvan como injerto. Muchos de los sustitutos de piel aprobados en los países desarrollados son costosos, no se encuentran disponibles en las farmacias o en el internet y deben ser aplicados por profesionales médicos en centros de cuidados de heridas adscritos a las compañías que los producen. Por esta razón, Colombia necesita desarrollar tecnología para elaborar sustitutos de piel accesibles a la mayoría de la población y que sean eficaces en promover la regeneración de las heridas en que se aplican.

El Grupo de Trabajo en Ingeniería de Tejidos, del departamento de Farmacia, de la Universidad Nacional de Colombia, fue creado con el objetivo de establecer las tecnologías requeridas para la elaboración y escalamiento de la producción de tejidos blandos artificiales que puedan ser empleados como sustitutos de tejidos naturales en el tratamiento de heridas, o como modelos biológicos que permitan estudiar los mecanismos de reparación y regeneración observados al injertar tejido artificial en pérdidas de continuidad de tejidos.

Con este enfoque ha desarrollado soportes de colágeno tipo I y tejido conectivo artificial autólogo que cuando se injertan en heridas de espesor parcial en modelos pre-clínicos de mucosa oral mejoran la cicatrización con respecto a heridas que cierran por segunda intención [4, 5]. Aunque los datos preclínicos indican que el tejido conectivo artificial autólogo optimiza la regeneración de la herida con respecto al soporte de colágeno tipo I acelular, la eficacia y seguridad en humanos del soporte solo ha sido sugerida por estudios clínicos no controlados realizados con consentimiento informado, en pacientes con heridas agudas y crónicas de piel de etiología diversa (porcentaje de éxito cercano al 80%. Datos no publicados). Actualmente el grupo estudia el efecto de la microestructura de soportes de colágeno en el proceso de reparación de heridas inducidas en mucosa oral de conejo [6].

Desde la antigüedad, las personas han usado plantas y preparaciones de plantas para acelerar el cierre de heridas de la piel [7], generalmente basados en la tradición, sin evidencia científica de su efectividad, composición y modo de acción [8]. En el año 2010, el grupo decidió potenciar la bioactividad de los soportes de colágeno I que ha desarrollado, y planteó evaluar la eficacia de la asociación física del extracto de flores de caléndula (*Calendula officinalis*), de reconocida actividad antiinflamatoria y aceptado por el INVIMA como antioxidante y cicatrizante por vía local [9]. En consecuencia, se formuló el proyecto “Evaluación de la reparación de heridas cutáneas con soportes de colágeno que contienen extracto de caléndula”, aprobado por el Programa Nacional de Biotecnología del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias en la Convocatoria 521 del 2010.

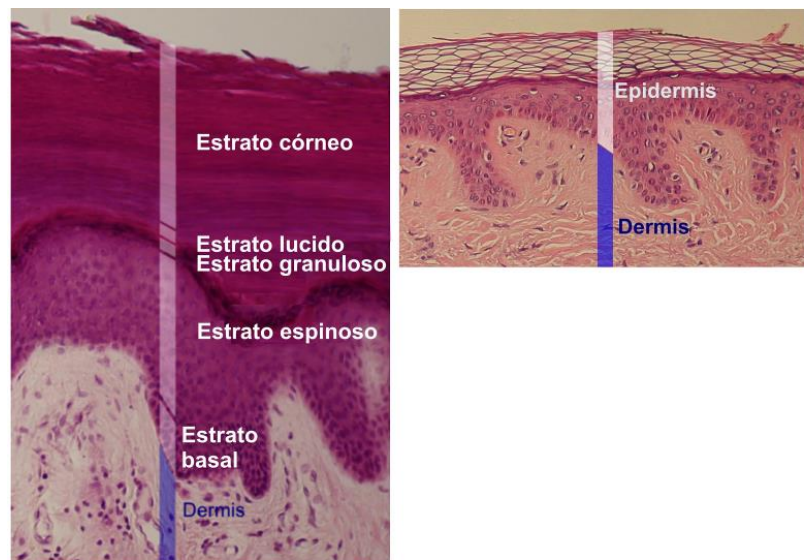
En la primera etapa de desarrollo de este proyecto, se evaluaron los soportes de colágeno tipo I como un sistema de liberación de un extracto hidroglicólico de caléndula. Los resultados, mostraron que los soportes asociados por inmersión con un extracto hidroglicólico de flores de caléndula, liberan aproximadamente el 60% de su carga inicial en un tiempo menor a 24 horas[10]. Esto debido a las características microestructurales del soporte (tamaño de poro $\sim 172.9 \mu\text{m}$, interconectividad de poro y porosidad $>90\%$) [6], que favorecen los fenómenos de difusión [10], esto condujo a la llevar a cabo una segunda etapa, realizando modificaciones al soporte de colágeno incorporando microesferas de gelatina-colágeno, para que liberen controladamente los metabolitos secundarios activos del extracto de caléndula durante más de 72 horas, tiempo en el que ocurre la fase inflamatoria del cierre de heridas de piel [11] sin alterar la microestructura del soporte (tamaño de poro, interconectividad de poro y porosidad), ya que estas características determinan su bioactividad [12, 13], la cual ya ha sido demostrada en trabajos previos del grupo [4, 5]. En este trabajo se llevó a cabo la tercera etapa, con el objetivo de evaluar la biocompatibilidad del soporte de colágeno tipo I asociado a un extracto hidroglicólico de flores de caléndula mediante pruebas *in vitro* de citotoxicidad y reactividad biológica. Además, evaluar su eficacia en un modelo animal lagomorfo de heridas cutáneas de espesor total.

2. Marco teórico

2.1 La piel y sus funciones

La piel es un órgano externo que continuamente confronta ambientes adversos y funciona como un sistema de defensa primario. Protege de los rayos UV y de los microorganismos; adicionalmente, actúa como un órgano sensorial y un regulador primario de la temperatura porque constituye una barrera de permeabilidad que controla el movimiento de agua y otros electrolitos[14].

La piel está compuesta por dermis y epidermis [14]. La epidermis derivada del ectodermo embrionario, es una capa superficial delgada de queratinocitos estratificados que provienen de las células proliferantes del estrato basal. Se relaciona estrechamente con la dermis subyacente a través de la lámina basal, a la cual se adhiere mediante conexiones de fibras proteicas formando una microarquitectura de crestas y valles. Cuando las células del estrato basal se dividen son empujadas apicalmente y se diferencian a queratinocitos; en el proceso acumulan crecientemente filamentos de queratina en su citoplasma y forman paquetes de esta proteína. A medida que se aproximan a la superficie, mueren y se desprenden de forma continua [15]. El aspecto cambiante de los distintos niveles del epitelio posibilita la distinción de 5 zonas: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lucido y estrato corneo (**Figura 2-1**) [14, 16].



Tomado de: URL: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Epidermal_layers.png?uselang=es#filelinks

Figura 2-1. Estratos de la epidermis. Estrato basal: formado por una capa de células sostenida por una lámina basal que reposa en la dermis subyacente, las células son cubioides, su núcleo es grande y el citoplasma basófilo. **Estrato espinoso:** tiene el mismo conjunto de organelos que el estrato basal pero su basofilia es menos intensa, presenta numerosos haces de filamentos intermedios de citoqueratina que radian desde la región perinuclear y finalizan en la densa placa de numerosos hemidesmosomas a lo largo de los límites interdigitalizados de las células. **Estrato granuloso:** formado por 3 a 5 capas de células aplanadas, presenta cuerpos de gran tamaño y forma irregular que se tiñen intensamente con colorantes básicos. **Estrato lucido:** es una capa de células delgadas, que se tiñen ligeramente, localizadas entre el estrato granuloso y estrato córneo. **Estrato córneo:** está formado por muchas capas de células planas, altamente queratinizadas que no contienen núcleo ni organelos intra-citoplasmáticos, toda la célula está llena de filamentos de queratina. En la capa más externa, las células sin vida totalmente queratinizadas se desprenden y finalmente se descaman [15].

La dermis, derivada del mesodermo, se encuentra debajo de la epidermis y se divide en 2 capas, dermis papilar y dermis reticular, que difieren en cuanto a su porosidad. La dermis está compuesta principalmente de colágeno, glicosaminoglicanos, elastina y otras proteínas de matriz extracelular, además de una densa red de capilares llamados plexus dermal. El principal constituyente celular de la dermis es el fibroblasto, seguido de células inmunes y células endoteliales vasculares. La dermis proporciona fuerza, elasticidad y tacto. Dentro de la dermis se pueden observar derivados ectodérmicos tales como apéndices epidermales (folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas), los cuales juegan un papel importante en la protección y termorregulación [16].

La dermis y epidermis expresan mediadores inflamatorios como prostaglandinas, eicosanoides, leucotrienos, histaminas y citoquinas sintetizadas y secretadas por queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales y células del sistema inmune. De igual forma, en la piel se secretan moléculas que absorben luz UV (melanina, vitamina D y C), así como proteínas de choque térmico, que le permiten funcionar como barrera térmica [14].

2.2 Proceso de reparación de heridas en piel

Cuando la pérdida o lesión de un tejido diferente al tejido epitelial perturba su arquitectura normal, este no se reemplaza por uno igual (regeneración); en su lugar procede la reparación, proceso que comprende 3 etapas traslapadas en las que la interacción dinámica de mediadores solubles, células sanguíneas, matriz extracelular y células del tejido afectado juegan un papel primordial. Estas etapas son: inflamación, producción de tejido de granulación y remodelamiento (**Figura 2-2**).

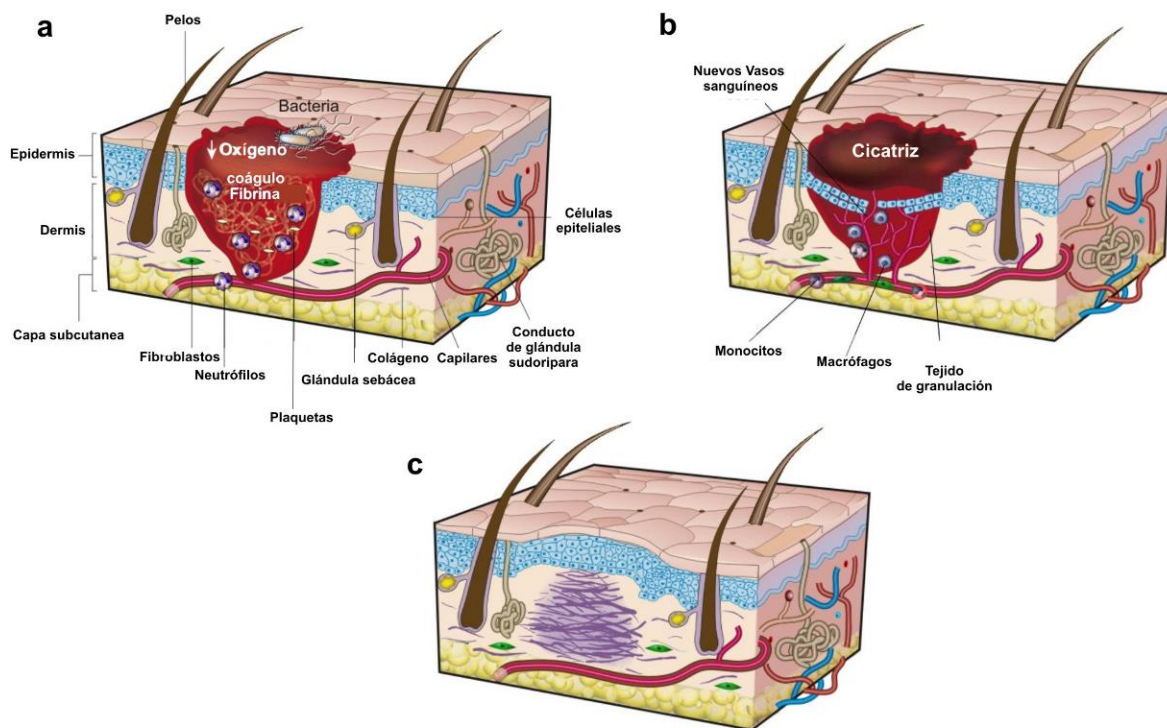


Figura 2-2. Etapas del cierre de heridas y formación de cicatrización. A. Inflamación. B. Generación de tejido de granulación. C. Remodelamiento. Tomado de: Gurtner et al. 2008.

2.2.1 Inflamación

La inflamación es lo primero que ocurre después del daño del tejido; en esta fase, se activa la cascada de coagulación y se reclutan células del sistema inmune con el fin de evitar la pérdida de sangre, la pérdida de fluidos y controlar la infección. La activación de la cascada de la coagulación que convierte fibrinógeno soluble en fibrina insoluble, es iniciada por la interacción de las plaquetas con el Factor Von Willebrand secretado por las células endoteliales de los vasos sanguíneos lesionados. Ésta interacción media la adhesión inicial de las plaquetas al colágeno de la matriz extracelular expuesta cuando el endotelio se daña y conduce a su activación. Después de que las plaquetas se adhieren y se activan reclutan más plaquetas sobre su superficie formando un agregado plaquetario, sobre el que se deposita y entrecruza la fibrina. El coágulo de fibrina formado evita la pérdida de sangre o fluidos y sirve como soporte primario para la infiltración celular (células inflamatorias, epiteliales y fibroblastos). Adicionalmente, las plaquetas liberan factores de crecimiento, entre ellos el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que inducen la activación y quimioatracción de fibroblastos y otras células mesenquimales [17, 18].

Los neutrófilos son reclutados en el sitio de la lesión en respuesta a la activación del complemento, la degranulación de las plaquetas y la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos que resultan de la degradación bacteriana. Su papel principal es eliminar mediante endocitosis los microorganismos que invaden la herida expuesta. Luego de 2 a 3 días, los monocitos llegan a la herida y se diferencian a macrófagos, estos limpian la herida eliminando restos celulares, producen numerosas citoquinas, factores de crecimiento y factores angiogénicos los cuales juegan un papel importante en la regulación de la fibro-proliferación y la angiogénesis (**Figura 2-2, Panel A**) [18].

2.2.2 Formación de tejido de granulación

De 2 a 10 días después del daño, se forma el tejido de granulación que reemplaza al coagulo de fibrina formado inicialmente. Está constituido por fibroblastos, macrófagos y tejido vascular, embebidos en una matriz laxa de colágeno, fibronectina y ácido hialurónico. Mediante un proceso denominado angiogénesis, el cual es regulado por factores como el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y el factor de crecimiento básico de los fibroblastos (FGF2 o bFGF), en esta fase se forman nuevos vasos sanguíneos con el fin de suplir al sitio en reparación con nutrientes y oxígeno [18-20].

Algunos de los fibroblastos que migran hacia el tejido dañado se diferencian a miofibroblastos, células contráctiles encargadas de unir los bordes de la herida produciendo su contracción, que además producen colágeno tipo III y proteínas de matriz extracelular [21]. Al mismo tiempo, las células epiteliales proliferan, se diferencian y migran desde los bordes a través de la herida cubriendo el tejido de granulación. Una vez esto ha ocurrido, las células epiteliales revierten su fenotipo migratorio a uno no migratorio y se anclan a la membrana basal a través de hemidesmosomas para restaurar la integridad de la barrera epitelial (**Figura 2-2, Panel B**) [18, 19].

2.2.3 Remodelamiento

Esta fase comienza de 2 a 3 semanas después de la generación de la herida y tarda un año o más en finalizar. Consiste en una involución gradual del tejido de granulación debido a que la mayoría de miofibroblastos, células endoteliales y macrófagos mueren de forma programada (apoptosis). Posteriormente, metaloproteinasas (colagenasas) secretadas por los fibroblastos, macrófagos y células endoteliales reemplazan el tejido remanente compuesto principalmente por colágeno tipo III por tejido con un mayor contenido de colágeno tipo I [18]. Este proceso de reparación conduce a la formación de cicatriz que resulta en la pérdida funcional, anatómica y cosmética en la zona reparada (**Figura 2-2, Panel C**).

2.3 Tipos y cierre de heridas

La reparación de heridas en fetos es muy diferente a la reparación de heridas en adultos, en los primeros se observa un proceso regenerativo caracterizado por ausencia de cicatriz y fibrosis; en contraste, la herida en adultos crea cicatrices que pueden ser atróficas, hipertróficas o queloides. En la atrófica hay depresiones en forma de valles en la piel, la hipertrófica presenta una morfología de cicatriz más elevada y puede disminuir con el tiempo; por último, la queloide se caracteriza por ser elevada y expandirse más allá del margen de la herida original. La generación de un tipo dado de cicatriz depende de factores genéticos y del sitio anatómico en que ocurre la reparación [22].

2.3.1 Tipos de heridas

De acuerdo a su profundidad, las heridas pueden ser de 3 tipos:

- **Heridas superficiales de espesor parcial:** Afectan solamente el epitelio sin compromiso de la membrana basal y cierran sin formación de cicatriz. Su regeneración ocurre gracias a la migración de queratinocitos basales desde el borde de la herida, glándulas sudoríparas o folículos pilosos, los cuales proliferan para cubrir el área dañada [23].
- **Heridas profundas de espesor parcial:** Afectan el epitelio y el tejido conectivo subyacente, conduciendo a una reparación con formación de cicatriz [23].
- **Heridas de espesor total:** Comprometen todas las capas de la piel y cuando son mayores a 2 cm² cicatrizan con contracturas [24] y en algunos casos, dependiendo del tamaño de la herida, requieren de un injerto para que no se produzcan defectos funcionales y cosméticos severos. Sin embargo, cuando el injerto es autólogo hay limitaciones del sitio donante y se produce morbilidad [23].

2.3.2 Cierres de las heridas por primera y segunda intención

Dependiendo del tamaño de la herida y de la proximidad de sus bordes, el cierre se puede dar de 2 formas: cierre por primera intención y cierre por segunda intención. El cierre por primera intención ocurre cuando los bordes están próximos y se pueden unir empleando suturas, cintas quirúrgicas o dispositivos mecánicos. Este cierre se lleva a cabo entre las 12 y 24 horas siguientes, gracias a que las células epiteliales de los bordes de la herida migran hacia el centro y se da un balance apropiado de todas las fases de la reparación. Como resultado de este proceso la regeneración epitelial predomina sobre la fibrosis [23].

El cierre por segunda intención se da cuando los bordes de la herida no están próximos y en consecuencia, no se puede restaurar la arquitectura original. Este tipo de cierre conduce a la formación de tejido de granulación que lleva a la formación de cicatriz. En defectos grandes de la piel, el área original se reduce debido a la contracción llevada a cabo por los miofibroblastos. El tejido contraído que se produce puede impedir el movimiento y otras funciones en la zona afectada, además de causar un daño estético y emocional [23, 25, 26].

2.4 Ingeniería de tejidos en el tratamiento de la pérdida de tejidos

En heridas por traumas agudos, trastornos genéticos e intervenciones quirúrgicas, se presenta reparación con contracción y cicatrización, eventos que afectan cosmética, funcional y anatómicamente el sitio dañado. Los tratamientos convencionales más frecuentes son autoinjertos, homoinjertos, xenoinjertos y prótesis, sin embargo, estos recursos presentan algunas limitaciones. Los autoinjertos generan morbilidad en el sitio donante y están limitados por la cantidad de tejido disponible para el injerto; el homoinjerto, obtenido de donantes de la misma especie, generalmente de fuente cadavérica, puede producir rechazo y crear el riesgo de infección; por último, los xenoinjertos, obtenidos de otras especies diferentes al humano pueden generar incompatibilidad y riesgo de contaminación por agentes patógenos. La ingeniería de tejidos como campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida busca el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan y mejoren la función de un tejido, con el fin de solucionar los problemas anteriormente mencionados [27].

Esta rama de las ciencias médicas se basa en 3 pilares: células (madre o diferenciadas, autólogas o heterólogas), soportes (naturales o sintéticos) y reguladores (Químicos o físicos), para crear tejido artificial. Los soportes de origen natural pueden ser elaborados a partir de: colágeno tipo I, fibronectina, laminina, elastina, polipéptidos, hidroxiapatitas, ácido hialurónico, glicosaminoglicanos, quitosan y alginatos. Los soportes de origen sintético han sido elaborados empleando ácido poliglicólico, ácido poliláctico y sus copolímeros. Estos soportes deben ser seguros, biocompatibles, biodegradables, no inmunogénicos y clínicamente efectivos; además, deben presentar propiedades físicas y mecánicas similares al tejido natural y permitir un intercambio adecuado de nutrientes y productos de desecho [28].

2.5 Uso del colágeno en ingeniería de tejidos

El colágeno es el principal componente estructural de la matriz extracelular de los vertebrados y es la proteína más abundante del cuerpo en los mamíferos [29]. Posee 3 cadenas α que pueden ser codificadas por un mismo gen o por genes diferentes, dando lugar a la formación de homotrímeros o heterotrímeros, respectivamente. Hasta el momento, se han identificado 28 tipos de colágeno denominados con números romanos desde el I hasta el XXVIII. El colágeno tipo I, es la proteína extracelular más abundante y mejor estudiada de los vertebrados. Representa más del 90% de la masa

orgánica del cuerpo y es el principal colágeno de los tendones, ligamentos, córnea y tejidos conectivos intersticiales con la excepción del cartílago hialino, cerebro y humor vítreo. Es un heterotrímero ya que está constituido por dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$ [30].

Por mucho tiempo el colágeno se ha reconocido como un material seguro y altamente biocompatible [31], proporciona gran resistencia a la tensión y limitada extensibilidad, promueve la adhesión y migración de numerosos tipos celulares incluyendo monocitos, neutrófilos, queratinocitos y fibroblastos. Por sus características, el colágeno ha sido ampliamente estudiado [32, 33] y empleado para la manufactura de sustitutos comercialmente disponibles de hueso [34], piel [35], mucosa oral [36], cartílago [37], meniscos [38] y nervio [39]. Por esta razón nuestro grupo de investigación ha elaborado sustitutos de tejido conectivo oral basados en este biomaterial que han sido evaluados a nivel preclínico [4].

2.6 Biocompatibilidad de los soportes empleados en ingeniería de tejidos

Inicialmente, el término de biocompatibilidad se limitaba a los dispositivos de uso médico en contacto con tejidos vivos que permanecían por largos periodos de tiempo: lentes intraoculares, dispositivos para el manejo del ritmo cardiaco como marcapasos, desfibriladores automáticos implantables, prótesis de remplazo de cadera hechos con materiales como titanio o cerámica, dispositivos para el aumento y reconstrucción de tejidos suaves como siliconas, válvulas cardiacas, stents, entre otros. Bajo este enfoque, el término de biocompatibilidad se restringía a la "capacidad de un material para llevar a cabo una función específica con una adecuada respuesta del huésped frente al mismo" [40]. Sin embargo, a pesar de que muchos materiales cumplen la función para la que están diseñados, son inertes y no causan efectos adversos (toxicidad, inmunogenicidad, trombogenicidad, carcinogenicidad e irritación), ocurren inconvenientes que no se relacionan con su composición química y su función, pues una vez implantados el ambiente biomecánico y hemodinámico del receptor limita sus vidas útiles debido al desgaste. Por ejemplo, las aleaciones de titanio o cromo-cobalto con el tiempo liberan partículas que activan la respuesta inmune del paciente [41]. Por otra parte, algunos polímeros empleados en prótesis óseas estimulan la diferenciación celular, ya que las partículas liberadas por estos materiales pueden estimular la diferenciación a osteoclastos generando reabsorción ósea [42].

Actualmente, en las aplicaciones clínicas de los sustitutos tisulares se busca que sean bioactivos y biodegradables, es decir, que tengan un efecto positivo sobre un tejido vivo o sobre las células con que van a interactuar y que además sean recambiados por tejido propio, lo cual no estaba incluido en el concepto inicial de biocompatibilidad [40]. El nivel de bioactividad no solo depende de la composición química del material y de la función que va tener, si no del sitio en el cual va ser implantado, las propiedades del tejido que va a reemplazar y el tiempo requerido para su recambio [40]. Por esto, para que un producto de ingeniería de tejidos sea bioactivo se deben tener en cuenta varias características en su diseño, entre ellas la composición química del biomaterial de partida, la velocidad de degradación, las propiedades mecánicas y la microestructura [12]. Estas características deben estar relacionadas entre sí, por ejemplo, diferencias en el tamaño de poro, velocidad de degradación y características de superficie influyen en la migración, adhesión y proliferación celular a través del soporte afectando el recambio y los procesos de regeneración [12, 43].

Yannas, I. et al, 2013., ha demostrado que soportes de colágeno, empleados con frecuencia para la elaboración de sustitutos de piel, son bioactivos cuando se elaboran con un tamaño de poro de 20 a 125 μm y una porosidad mayor al 95%; estas características otorgan propiedades mecánicas y microestructurales adecuadas que favorecen su recambio por tejido no contraído con características similares a las del tejido original [12, 44]. Si el soporte no cumple con estas propiedades pueden ocurrir dos cosas: que se degrade rápidamente, impidiendo que las células se adhieran y ocurra contracción; o que el soporte sea muy estable, induciendo una reacción a cuerpo extraño o aislamiento por el tejido sin que se induzca regeneración [12, 45].

Por esta razón, se definió el concepto de biocompatibilidad para soportes de ingeniería de tejidos como “la capacidad para funcionar como sustrato que facilite la actividad celular apropiada y entregue un sistema de señales mecánicas y moleculares, para optimizar la regeneración celular sin inducir ninguna respuesta adversa sistémica o local en el huésped” [40].

2.7 Sustitutos artificiales de piel

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, ha autorizado la aplicación de sustitutos de piel entre los que se encuentran Biobrane®, Dermagraft®, Integra®, Apligraf®, Matriderm® y Orcel® [46]. El primero en ser aprobado fue Integra®, este producto está constituido por un soporte entrecruzado de colágeno bovino y glicosaminoglicanos cubierto por una membrana de silicona que actúa como una capa epidermal provisional. Después de ser injertado, el

soporte de colágeno- glicosaminoglicanos es recambiado por las células que lo pueblan desde el lecho de la herida. Una vez se logra la formación de la dermis en el sitio tratado, se retira la capa de silicona [47].

El primer sustituto basado en células vivas aprobado por la FDA fue Apligraf®, constituido por una capa epidermal formada por queratinocitos humanos con un estrato corneo diferenciado y una capa dermal constituida por fibroblastos humanos sembrados en colágeno bovino tipo I [47, 48]. Otro sustituto vivo es Dermagraft®, elaborado con fibroblastos humanos que han sido sembrados en un soporte de poliglactina. Al igual que en los anteriores, los fibroblastos presentes en el lecho de la herida migran a estos sustitutos y los recambian por matriz extracelular que ellos mismos sintetizan para producir el nuevo tejido [47, 48].

En Colombia, los sustitutos mencionados son costosos y de difícil consecución; de ahí, la importancia de desarrollar el área de la ingeniería de tejidos. Nuestro grupo ha elaborado soportes de colágeno tipo I de origen bovino y tejidos artificiales con células autólogas que al ser usados como injerto en heridas de espesor parcial mejoran el cierre de la herida y disminuyen la cicatrización [4, 49, 50]. La inclusión de células en el soporte para obtener tejido artificial optimiza el tratamiento pero eleva su costo. Con el fin de disminuir costos y hacer accesible los productos que hemos desarrollado, este trabajo estudió la bioactividad de soportes de colágeno acelulares asociados a un extracto hidroglicólico de *C. officinalis*, planta usada en la tradición popular para el tratamiento de lesiones de piel.

2.8 Cierre de heridas empleando extractos de *Calendula officinalis*

Calendula officinalis. (Linn. Familia Asteraceae) ha sido usada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades, se ha reportado que el extracto de la flor de esta planta tiene diversas actividades farmacológicas y funciona como antioxidante [51, 52], anti-inflamatorio [52, 53], anti-bacterial [52, 54], anti-viral y posee actividades citotóxicas frente a células tumorales [52, 55]. La actividad farmacológica de esta planta se relaciona con el contenido de varias clases de metabolitos secundarios tales como flavonoides, esteroides, carotenoides, taninos, saponinas, triterpenos, polisacáridos, mucilagos y resinas, que ejercen un efecto positivo en la reparación de heridas al usarlos en el campo de la fitoterapia [52].

En estudios clínicos de fase III, se mostró que el uso de *C. officinalis* en forma tópica fue efectivo para la prevención de dermatitis aguda de grado 2 después de una irradiación postoperatoria de cáncer de seno [56]. Otros estudios mostraron que el extracto de *C. officinalis* puede tener actividades inmunomoduladoras y actividades citotóxicas anti-tumorales *in vitro* inhibiendo la proliferación celular de líneas tumorales; adicionalmente, *in vivo* puede inhibir la formación de tumores inducidos en ratones nude [55]. En ensayos con ratas, que evaluaron el cierre de heridas cutáneas usando geles de caléndula, mostraron que la herida cierra más rápido, con mayor producción de colágeno e hidroxiprolina que una herida sin tratar [57]; de forma similar, generando heridas termales se mostró el efecto de este extracto en la restauración de la piel [58].

En Colombia, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), acepta su aplicación tópica como anti-inflamatorio y cicatrizante; así como, su administración oral como anti-inflamatorio [9]; sin embargo, a pesar de su uso extendido en el cierre de heridas, hasta la fecha no se han reportado estudios en ingeniería de tejidos que incorporen este extracto en soportes de colágeno para evaluar cierres de heridas en piel.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar la biocompatibilidad y eficiencia de soportes de colágeno tipo I asociados con extractos de *Calendula officinalis* en un modelo animal lagomorfo de heridas cutáneas

3.2 Objetivos específicos

1. Establecer la dosis del extracto de caléndula que se necesita para cargar los soportes de colágeno tipo I.
2. Evaluar *in vitro* la citotoxicidad de soportes de colágeno que contienen extracto de caléndula.
3. Evaluar el desempeño de soportes de colágeno que contienen extracto de caléndula como implante en un modelo animal lagomorfo de heridas cutáneas de espesor total

4. Materiales y Métodos

4.1 Consideraciones éticas

Este trabajo hace parte del proyecto financiado por Colciencias “Evaluación del cierre de heridas cutáneas con soportes de colágeno que contienen extracto de caléndula” aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias (Acta 5, 11 de octubre de 2010).

La manipulación de los animales fue llevada a cabo siguiendo los lineamientos internacionales [Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (National Association for Biomedical Research, 2007; National Institute of Health, 1996), ARVO] y nacionales [Artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Ley 84 del 27 de diciembre de 1989] con el fin de minimizar el sufrimiento animal. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo por personal calificado, el material cortopunzante fue eliminado en el guardián y los desechos biológicos se guardaron refrigerados en bolsas rojas, mientras eran recogidos para su incineración, de acuerdo con los protocolos establecidos por la Universidad Nacional de Colombia.

4.2 Extracto de caléndula

En todos los ensayos se empleó un extracto hidroglicólico de flores de caléndula comercial (NEYBER Ltda). El extracto de caléndula fue filtrado usando una membrana de 0,2 μ m y almacenado a 4°C. Las características del extracto, proceso de producción y control de calidad se presentan en el **Anexo 1**.

4.3 Cultivo de fibroblastos L929

En los ensayos de citotoxicidad se empleó la línea celular de fibroblastos L929 (NCTC clone 929, American Type Culture Collection (ATCC) número: CCL-1™). Las células fueron cultivadas en cajas T-75 hasta alcanzar una confluencia del 80% en Medio Esencial Mínimo de Dubelco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino 10%, penicilina (100 UI/mL), estreptomycin (100 μ g/mL), anfotericina B (0,5 μ g/mL), vitaminas 1x (Gibco ®) y piruvato de sodio 1x (Gibco ®). Los cultivos

fueron mantenidos en atmósfera de aire 95% y CO₂ al 5% a 37°C, remplazando el medio cada tercer día. Se emplearon células de tercer pasaje para todos los ensayos.

4.4 Cultivo de fibroblastos primarios de piel de conejo

En los ensayos de citotoxicidad también se incluyeron fibroblastos primarios de piel de conejo, aislados siguiendo un procedimiento estandarizado en nuestro grupo [4, 49, 50]. Brevemente, un conejo de raza Nueva Zelanda de 3 meses de edad y un peso aproximado de 2,5 kg fue anestesiado aplicando intramuscularmente 1mL/kg de la mezcla de clorhidrato de ketamina 50 mg/kg (Imalgene® 1000) y xylazina 5mg/kg (Seton®2%) en solución salina estéril USP [59]. Después de desinfectar la zona de excisión (zona dorsal del animal), se tomó una biopsia de espesor total de la piel empleando un punch para biopsia de 8mm de diámetro. El tejido obtenido fue lavado con PBS suplementado con penicilina 200 U/mL, estreptomicina 200 ug/mL y anfotericina 0,5 ug/mL (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Posteriormente, se separó mecánicamente la dermis y se cortó en fragmentos de 1mm³ (explantes), que se lavaron y colocaron en cajas de cultivo T-25 (Gibco, Invitrogen). Los explantes fueron cubiertos con medio DMEM suplementado como se mencionó anteriormente y los cultivos fueron mantenidos en atmósfera de aire 95% y CO₂ al 5% a 37°C, cambiando el medio cada tercer día. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%, se incubaron con tripsina (0.25% (p/v)) / EDTA (0.53mM), durante 5 min a 37°C. Luego, la tripsina fue inhibida con medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino y la suspensión celular fue centrifugada a 200 g por 3 min. Después de lavar con PBS y volver a centrifugar las células fueron suspendidas en medio DMEM y subcultivadas. En el experimento, se usaron células de tercer pase

4.5 Obtención de plasma de conejo

El plasma autólogo de los conejos fue empleado como diluyente del extracto de caléndula antes de asociarlo al soporte de colágeno y usarlo como injerto en los animales. Para la obtención de plasma, se siguió el protocolo descrito en el *Current Protocols in Immunology, unit 1,7* [60]. La sangre fue tomada de la arteria auricular de la oreja del conejo, previo a su punción se froto el extremo caudal con un algodón impregnado con etanol (70%) para facilitar la visualización de la arteria. La punción arterial se realizó con aguja 21G y la muestra de sangre fue recolectada en tubos vacutainer que contenían citrato de sodio como anticoagulante (2 tubos de 4,5mL cada uno). La muestra recolectada fue centrifugada a 200g x 10 min, el sobrenadante (plasma) fue recolectado y almacenado a -20 °C.

4.6 Cuantificación de proteína total del plasma de conejo

La concentración de proteína total presente en el plasma de conejo fue cuantificada mediante el método de ácido bicinónico [61]. Los datos obtenidos fueron interpolados en una curva patrón de albumina sérica bovina con un rango de concentración de 0-200ug con un r^2 de 0,99. Todas las muestras de plasma de conejo se ajustaron a la misma concentración de proteína total (1.450ug/mL), con solución salina estéril USP. El plasma fue almacenado a -20 °C hasta su empleo para la dilución del extracto de caléndula y asociación al soporte.

4.7 Metodología objetivo específico 1 (Establecer la dosis del extracto de caléndula que se necesita para cargar los soportes de colágeno tipo I).

4.7.1 Evaluación de la citotoxicidad celular inducida por el extracto de caléndula (determinación de dosis de carga)

Para determinar la dosis de carga del extracto de caléndula en los soportes de colágeno, se realizaron ensayos de citotoxicidad adaptando el protocolo descrito en la norma ISO 10993-5 (Parte 5: Pruebas de citotoxicidad *in vitro*), debido a que esta descrito solamente para dispositivos médicos [62]. La viabilidad celular fue determinada mediante la reducción del reactivo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difenil bromuro de tetrazolium] por células metabólicamente activas. El procedimiento se realizó con la línea celular L929 y los fibroblastos primarios de piel de conejo, por triplicado en 5 ensayos independientes (5 réplicas); como control positivo de citotoxicidad se empleó DMSO 25% y como control negativo se empleó silicona 0,2g/mL.

Se incubaron 1×10^4 células L929/pozo y 1×10^3 fibroblastos primarios/pozo en cajas de cultivo de 96 pozos en medio DMEM suplementado (100 μ L/pozo) por 24 h, 5 % CO₂, 37 °C y humedad > 90 %. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido y las células fueron incubadas en las mismas condiciones por 24h con diferentes concentraciones del extracto de caléndula (0, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 1%, 1,2%, 1,4%, 1,6%, 1,8% y 2%), las diluciones fueron realizadas en medio de cultivo DMEM suplementado. Una vez realizada la incubación, se adicionó MTT y se incubó por 2h a 37°C, el formazán precipitado fue solubilizado con DMSO y la absorbancia o densidad óptica (DO) fue leída a una longitud de onda de 570 nm (DO_{570nm}). El número de células vivas fue correlacionado con la cantidad de formazan formado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{100 \times \text{DO}_{570\text{nm}} (e)}{\text{DO}_{570\text{nm}} (b)}$$

e: Promedio de la DO de la muestra (extracto de caléndula)

b: Promedio de la DO del blanco (cultivo de células sin extracto)

Adicionalmente, mediante microscopia de luz se evaluaron las alteraciones morfológicas de las células adaptando los protocolos establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 36, capítulo 87)[63], en el ítem de pruebas de reactividad biológica, *in vitro*. De esta manera se determinaron los grados de reactividad biológica (nulo (0), escaso (1), leve (2), moderado (3) y grave (4)) inducidos en las células por las diferentes diluciones del extracto.

4.8 Metodología objetivo específico 2 (Evaluar *in vitro* la citotoxicidad de soportes de colágeno que contienen extracto de caléndula).

4.8.1 Asociación del soporte con el extracto de caléndula

Una vez establecida la dosis de carga del extracto, soportes de colágeno tipo I de 4 cm² elaborados por metodologías descritas anteriormente por nuestro grupo [64, 65], fueron asociados por inmersión con el extracto de caléndula. Para esto, los soportes fueron colocados en cajas de cultivo de 6 pozos (Costar®, Inc) y sumergidos en 2 mL de extracto de caléndula por 2h a 37 °C. Posteriormente, se eliminó el exceso de extracto con una micropipeta.

4.8.2 Evaluación de la citotoxicidad celular inducida por el soporte de colágeno cargado con extracto de caléndula.

Después de asociar el soporte de colágeno con el extracto de caléndula, se evaluó la citotoxicidad y reactividad biológica inducida por los metabolitos secundarios liberados *in vitro*. Para esto, se utilizó 1mL de DMEM suplementado como vehículo de extracción, se incubó 24 h (5 % CO₂, 37 °C y humedad > 90 %); se retiró el vehículo de extracción y se evaluó su citotoxicidad en células L929 y fibroblastos de piel de conejo como se indicó anteriormente en la sección 4.7.1. Soportes sin extracto de caléndula y con la misma concentración de plasma autólogo fueron utilizados como control.

4.9 Metodología objetivo específico 3 (Evaluar el desempeño de soportes de colágeno que contienen extracto de caléndula como implante en un modelo animal lagomorfo de heridas cutáneas de espesor total).

4.9.1 Diseño experimental animal

El número de animales empleado en el estudio fue calculado usando el programa Epi Info 6 Statcalc, para una precisión y un nivel de confianza de 95%. Se emplearon 39 conejos Nueva Zelanda de 3 meses de edad y un peso aproximado de 2,5 kg, distribuidos en 3 grupos de 13 individuos cada uno; en todos los conejos se hicieron 2 heridas dorsales contralaterales. En los animales del **grupo 1**, una herida fue tratada con soporte de colágeno asociado al extracto de caléndula (SCAE) y la otra se dejó cerrar por segunda intención (SI). En los animales del **grupo 2**, una herida fue tratada con soporte de colágeno sin extracto (SC) y la contralateral se dejó cerrar por segunda intención (SI). En los animales del **grupo 3**, una herida fue tratada con SC y la contralateral con SCAE (**Figura 4-1**). En cada grupo cada tratamiento fue realizado de manera aleatoria.

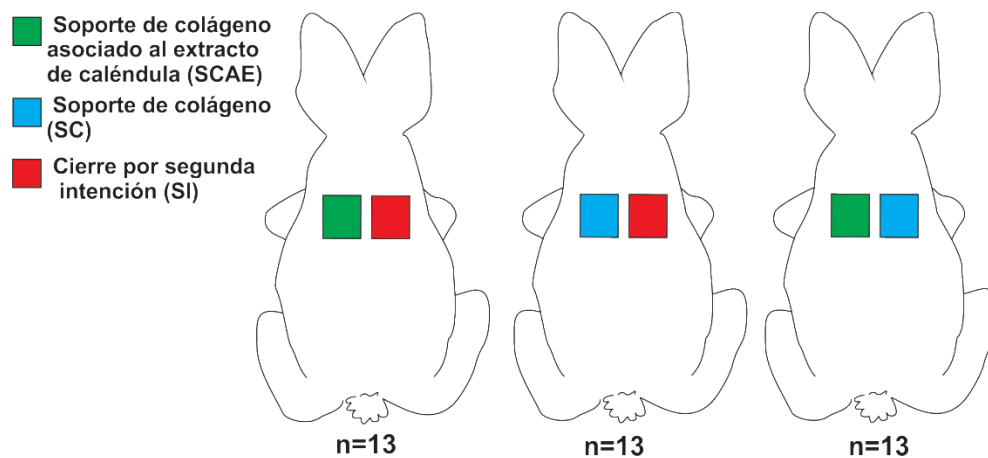


Figura 4-1. Distribución de unidades experimentales y asignación de tratamientos a cada unidad experimental.

4.9.2 Procedimiento quirúrgico y posicionamiento de los soportes de colágeno con y sin extracto de caléndula.

Los animales fueron rasurados y anestesiados siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.4. Antes de la excisión, se realizó marcaje de la zona, desinfección y se administró anestesia local

infiltrativa con 0.5 mL lidocaína al 1% epinefrina 1:200.000 (**Figura 4-2, Panel A**). Posteriormente, se realizaron 2 heridas de espesor total contralaterales de 4cm² (**Figura 4-2, Panel B**). Todos los defectos tenían el mismo tamaño, se manejaron con la misma técnica quirúrgica y fueron realizados por 2 cirujanos. En todos los casos, el material injertado (SCAE y SC) fue cortado en la cantidad requerida de acuerdo al tamaño del defecto e inmovilizado mediante 4 puntos simples, uno en cada esquina de la herida con suturas reabsorbibles 4 ceros (Vicryl®, Ethicon, Inc., Jhonson & Jhonson Company, West Somerville, NJ, USA) (**Figura 4-2, Panel C**). Luego de posicionar los soportes, se cubrieron con gasa vaselinada (vaselina USP) mediante la técnica de capitoneo para evitar deshidratación de la herida (**Figura 4-2, Panel D**); posteriormente se colocaron vendajes para evitar que el animal se retirara los soportes. Una semana después de la cirugía se realizó desbridamiento en la herida, retirando remanentes del soporte y tejido muerto y se colocó un nuevo soporte repitiendo este mismo procedimiento. La herida quedó cubierta hasta la cuarta semana, día en el cual el animal fue sacrificado.

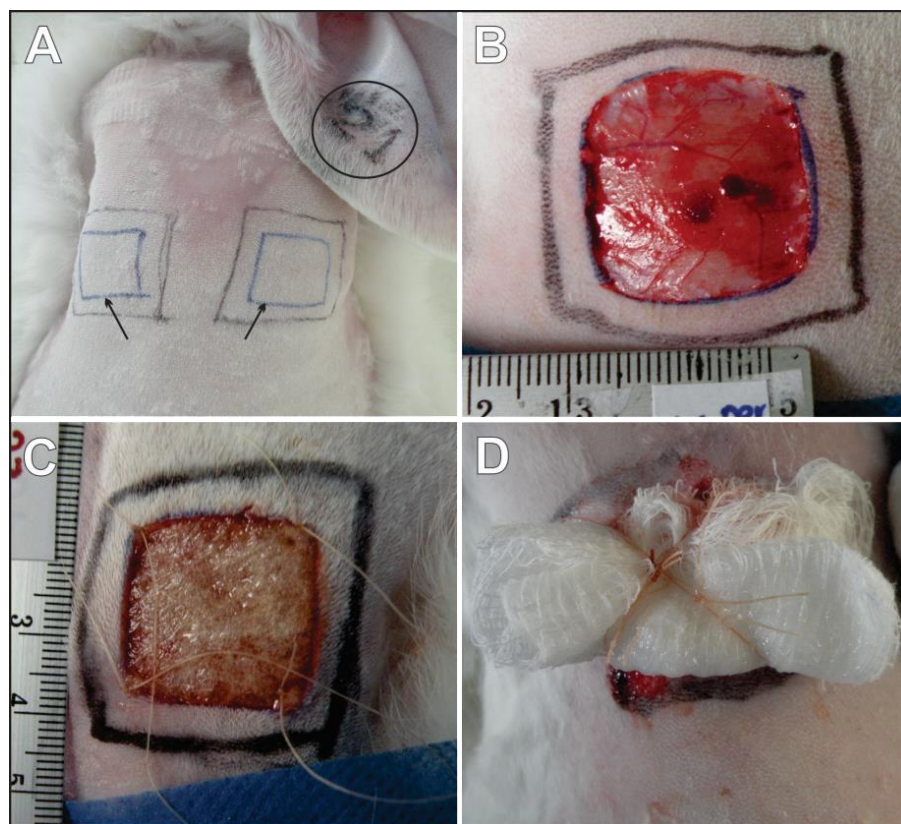


Figura 4-2. Posicionamiento de los soportes en heridas de espesor total. A. Delimitación de la herida en la zona dorsal media alta del conejo, las flechas indican el sitio de las heridas contralaterales realizadas, cada conejo fue marcado con tatuaje en la zona de la oreja. **B.** Herida de espesor total de

4cm². **C.** Posicionamiento del soporte con sutura. **D.** Técnica de capitoneo con gasa cubierta de vaselina USP.

4.9.3 Seguimiento clínico de las heridas

Se realizó seguimiento diario a los conejos con el fin de verificar su estado de salud y ajustar los vendajes para evitar que los animales se retiraran los soportes. En el séptimo día, al momento del desbridamiento de la herida se tomó registro de variables categóricas: persistencia o desalojo del injerto, presencia o no de úlceras, permanencia del material de sutura y evidencias clínicas de infección e inflamación. Se llevó registro fotográfico del día de la creación de la herida y el día del sacrificio. La evaluación de la apariencia clínica de las heridas al final del tratamiento fue llevada a cabo por un cirujano plástico.

4.9.4 Análisis histomorfométrico del tejido

Los animales fueron sacrificados 4 semanas después de creada la herida y se tomaron biopsias de espesor total del tejido de la zona injertada y de la zona dejada cerrar por segunda intención, incluyendo piel sana adyacente como control interno del ensayo. Las biopsias fueron fijadas en una solución de formol al 10% en PBS (pH 7,4 a 4°C durante 24 h), lavadas con PBS, embebidas en parafina y cortadas con ayuda de un micrótopo a un espesor de 5µm. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

Las secciones de los tejidos fueron evaluadas mediante microscopia de luz (Nikon ECLIPSE 55i, Nikon, Japón), para ello se tomaron fotografías de los cortes histológicos de manera aleatoria. A excepción de la evaluación de la disposición de fibras de colágeno, los datos obtenidos en la zona de la herida fueron normalizados respecto a los datos obtenidos en la zona sana adyacente de la siguiente manera: valor obtenido en la zona de la herida dividido por el valor obtenido en tejido sano adyacente. Se evaluaron 5 campos con el objetivo 40x (130 imágenes por tratamiento y el control para cada grupo), en las imágenes se analizaron:

- Número de capas del epitelio: Número de células desde la membrana basal hasta el estrato granuloso.
- Vascularización: Conteo de vasos por campo

- Evaluación de la intensidad del infiltrado inflamatorio: Conteo de leucocitos por campo, el valor promedio se intercaló en un rango de valores para clasificar la inflamación como nula, leve, moderada y severa [4, 66]
- Evaluación de la disposición de las fibras de colágeno: Porcentaje de campos clasificados de acuerdo a características cualitativas de la disposición de fibras en cuanto a orientación (aleatoria y paralela al eje del epitelio) y densidad (laxa, fibrosa y densa), por cada tratamiento y el control uniendo todos los grupos.

También se evaluaron 4 campos por corte histológico con el objetivo 4x para la medición de grosor de tejido conectivo (104 imágenes por tratamiento y control para cada grupo). Las imágenes histológicas fueron analizadas por un patólogo llevando a cabo un estudio ciego, usando el software NIS ELEMENTS AR 3.0 (Nikon, Chiyoda-Ku, Tokyo, Japan) y el software Image J [versión libre obtenida por medio electrónico del National Institutes of Health (NIH), USA].

4.9.5 Análisis estadístico

En el ensayo animal, para determinar el tipo de distribución de los datos se realizó la prueba de contraste de normalidad de Shapiro-Wilk, encontrando que los datos no se distribuyen normalmente. Para explorar la relación entre grupos pareados de variables ordinales y su significación estadística (p) se utilizó la prueba rho de Spearman.

5. Resultados

5.1 Resultado objetivo específico 1 (Establecer la dosis del extracto de caléndula que se necesita para cargar los soportes de colágeno tipo I):

5.1.1 Obtención de fibroblastos primarios de piel de conejo

La **Figura 5-1** muestra fibroblastos primarios de piel de conejo obtenidos mediante el método de explantes (**Panel A**), los cuales presentan núcleo grande plano y prolongaciones citoplasmáticas en forma de uso, morfología típica de células mesenquimales (**Panel B**). Su naturaleza fue confirmada con una inmunotinción antivimentina, proteína de tipo filamento intermedio que se expresa en células de origen mesenquimal como los fibroblastos, cuyos resultados fueron positivos (**Panel C**).

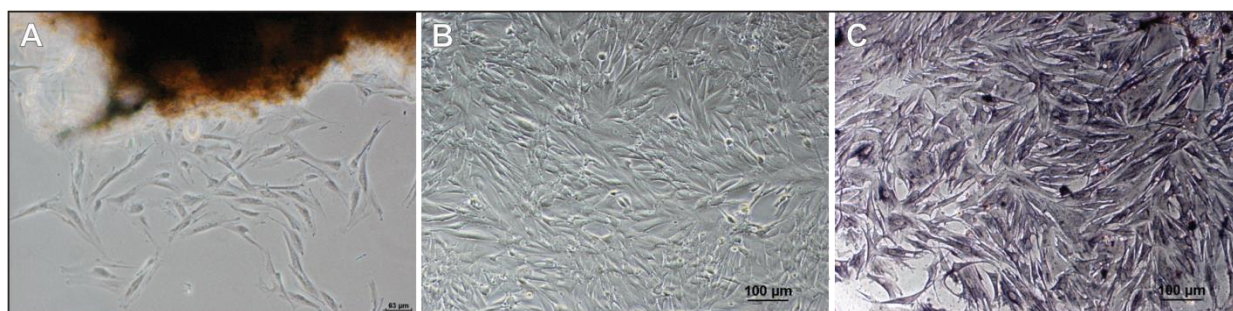


Figura 5-1. Fibroblastos de piel de conejo obtenidos a partir de la técnica de explantes. A. Explante y células que migran a partir de él. **B** Células primarias que alcanzaron confluencia. **C.** Fibroblastos provenientes de los explantes positivos para la expresión de vimentina.

5.1.2 Citotoxicidad celular inducida por el extracto de caléndula

Los fibroblastos primarios de piel, aislados como se describió anteriormente, y la línea celular L929 fueron empleados en los ensayos de citotoxicidad que permitieron determinar la dosis de carga en los soportes del extracto de caléndula. Al exponer a las células a diferentes diluciones del extracto (desde

0% hasta 2%), se encontró que en la línea celular L929 la disminución del porcentaje de viabilidad fue directamente proporcional al aumento de la concentración del extracto. En concentraciones superiores al 1% v/v no se detectó actividad metabólica, mientras que cuando se usaron concentraciones inferiores al 1% v/v la viabilidad celular fue superior al 60% (**Figura 5-2, Panel A**). Los fibroblastos primarios de piel de conejo fueron más susceptibles al extracto de caléndula, ya que el porcentaje de viabilidad observado cuando las células se expusieron a concentraciones del extracto superiores al 0,6% fue cero (**Figura 5-2, Panel B**).

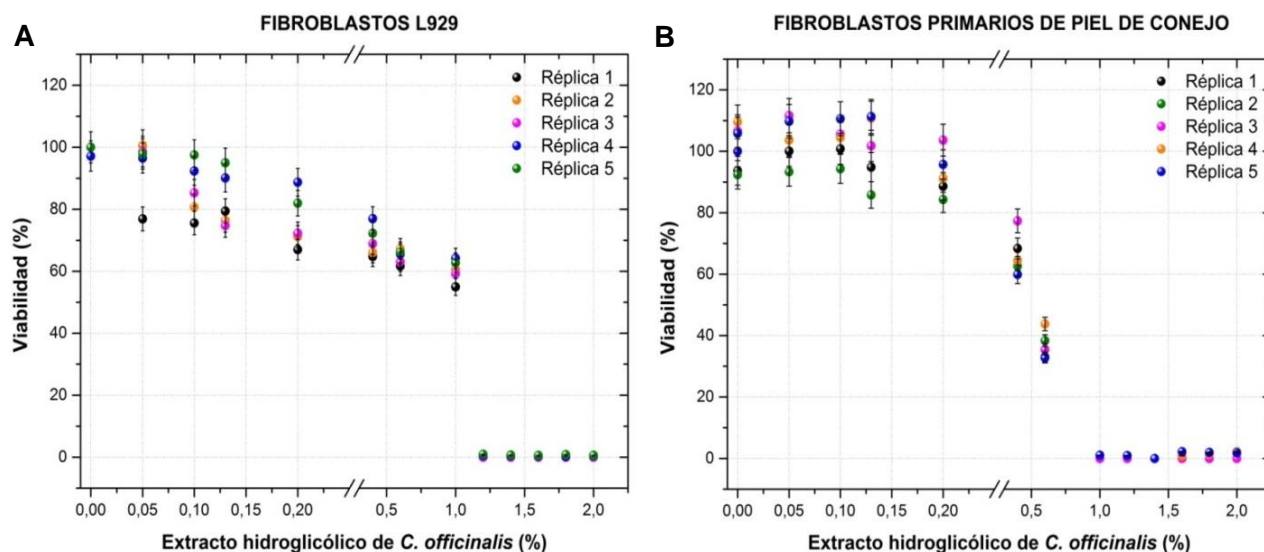


Figura 5-2. Porcentaje de viabilidad celular de células L929 (A) y fibroblastos primarios de piel de conejo (B) incubados con diferentes diluciones de extracto de caléndula.

La evaluación con microscopía de luz de las células, fibroblastos L929 y fibroblastos primarios de piel de conejo, expuestos al extracto mostró aumento de la reactividad biológica a medida que se incrementó la concentración del extracto. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de citotoxicidad (MTT), e indican que en la línea celular L929 concentraciones del extracto superiores al 1% v/v indujeron reactividad biológica grave (grado 4); mientras que cuando se utilizaron concentraciones menores al 1% v/v la reactividad biológica fue leve (grado 2) (**Figura 5-3, Panel A**). En los fibroblastos primarios de piel de conejo expuestos a concentraciones superiores a 0,6%, la reactividad observada fue grave (grado 4) (**Figura 5-3, Panel B**).

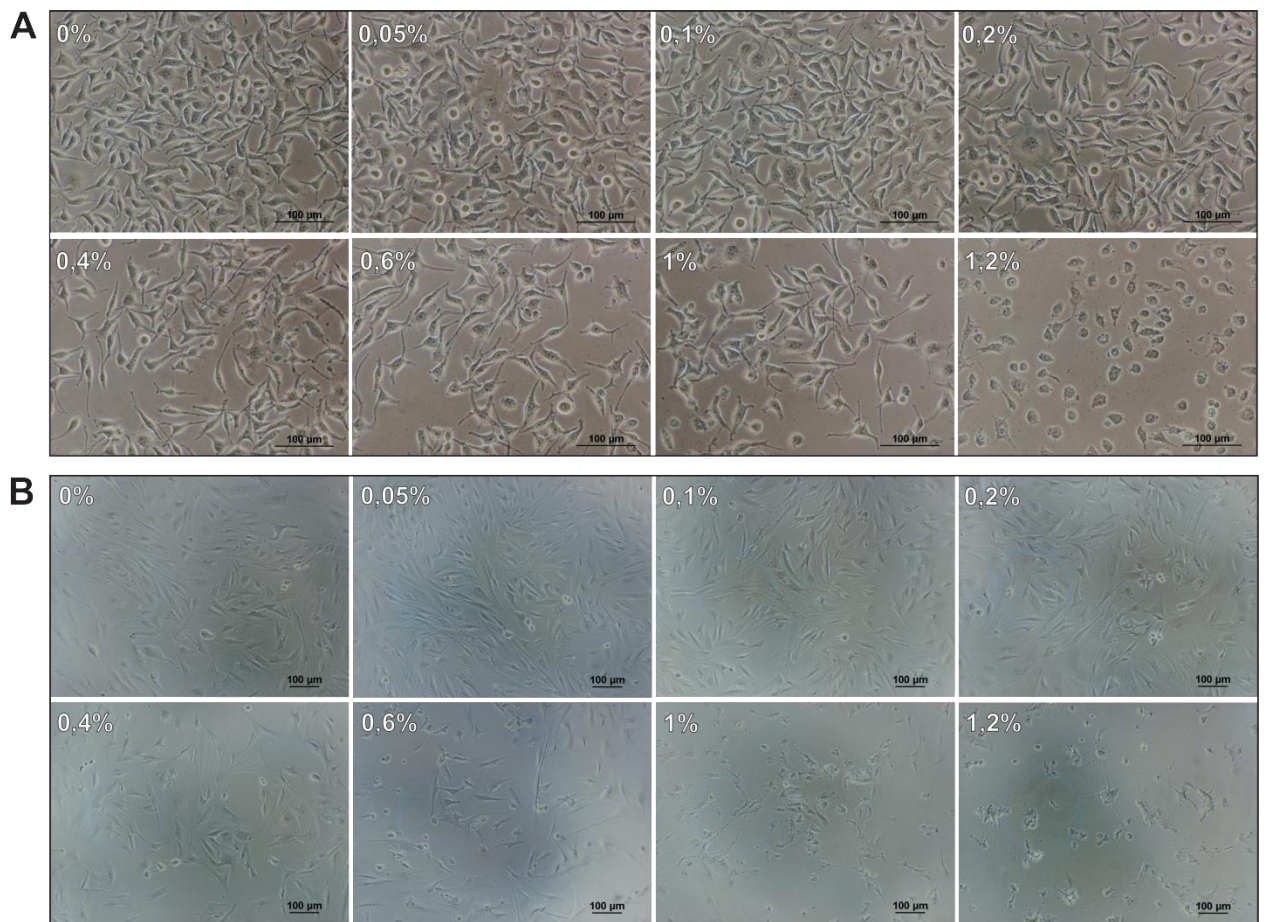


Figura 5-3. Reactividad biológica en la línea celular L929 (A). Reactividad biológica de fibroblastos de piel de conejo con diferentes diluciones del extracto de caléndula (B).

Con los datos de citotoxicidad celular y reactividad biológica, se estableció 1% v/v como la concentración del extracto de caléndula a cargar en soportes de colágeno tipo I modificados mediante la inclusión de microesferas de gelatina-colágeno. Esta decisión también tuvo en cuenta resultados anteriores del grupo, que indican que los soportes modificados con las microesferas liberan el extracto de caléndula controladamente y sin que éste alcance una concentración igual o mayor a la citotóxica [64].

5.2 Resultado objetivo específico 2 (Evaluar *in vitro* la citotoxicidad de soportes de colágeno que contienen extracto de caléndula).

Luego de asociar el extracto de caléndula (1% v/v) al soporte de colágeno tipo I modificado, se evaluó su citotoxicidad. Los resultados obtenidos con las células L929 y los fibroblastos primarios de piel, indican que el extracto liberado no supera el umbral de citotoxicidad indicado por la norma ISO 10993-5. Esta norma establece que si las células presentan una viabilidad mayor al 70% el producto es considerado como no-citotóxico (**Figura 5-4, Paneles A y B**). El control negativo incluido en éste ensayo, soporte de colágeno sin asociar al extracto (SC), no indujo citotoxicidad celular; mientras que, el soporte cargado con 100% de extracto muestra una total disminución de la viabilidad celular (control positivo de citotoxicidad).

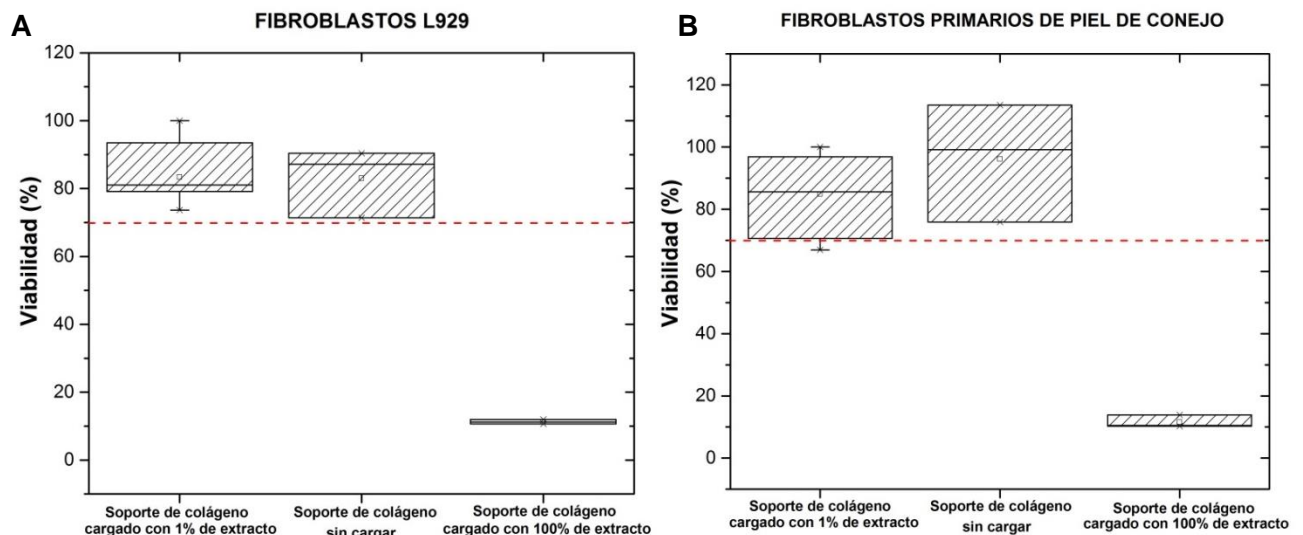


Figura 5-4. Porcentaje de viabilidad de células L929 (A) y fibroblastos primarios de piel de conejo (B) inducido por el soporte asociado al extracto. Las líneas punteadas indican el umbral de citotoxicidad. Se incluyen los controles del ensayo: soporte de colágeno sin cargar (control negativo de citotoxicidad) y soporte de colágeno cargado con 100% de extracto (control positivo de citotoxicidad).

La evaluación de reactividad biológica por microscopia de luz, muestra resultados similares a los obtenidos en el ensayo de citotoxicidad por MTT. El grado de reactividad biológica del soporte cargado con el extracto de caléndula fue nula (grado 0) con los 2 tipos de células, L929 y fibroblastos primarios de piel de conejo (**Figura 5-5. Paneles A y C, respectivamente**).

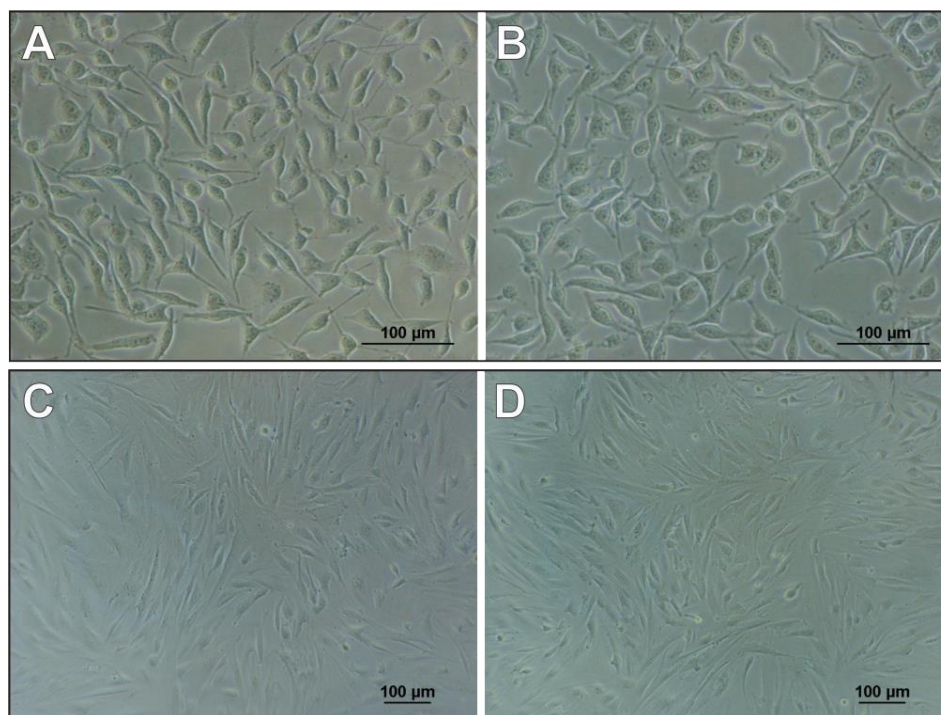


Figura 5-5. Evaluación de la reactividad biológica en fibroblastos L929 y fibroblastos primarios de piel de conejo frente al soporte de colágeno cargado con extracto hidroglicólico de caléndula. A. Células L929 contacto con el vehículo de extracción. **B.** Células L929 en medio de cultivo (control). **C.** Fibroblastos primarios en contacto con el vehículo de extracción **D.** Fibroblastos primarios en medio de cultivo (control)

Los fibroblastos primarios sembrados en los soportes cargados con extracto de caléndula y sin cargar, se mantuvieron metabólicamente activos luego de 7 días de incubación. La **Figura 5-6, Panel A** evidencia la presencia de un precipitado púrpura en su citoplasma indicativo de la reducción del MTT.

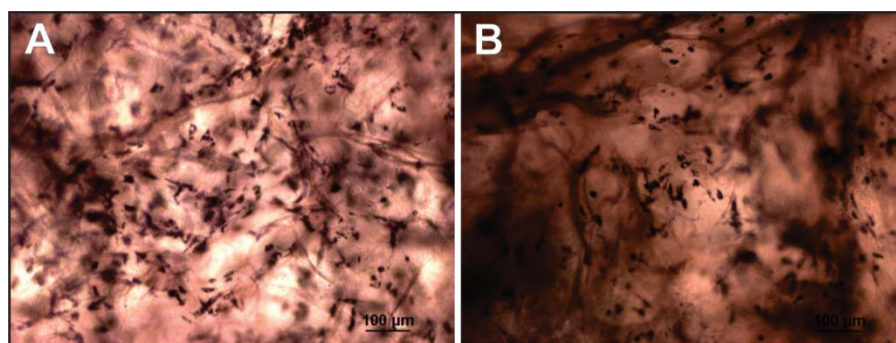


Figura 5-6. Adhesión y viabilidad de células primarias en los soportes de colágeno cargados con extracto hidroglicólico de caléndula luego de 7 días de cultivo. A. Células sembradas en soporte de colágeno asociado a extracto de caléndula 1% v/v. **B.** Células sembradas en soportes de colágeno sin asociar al extracto (control).

5.3 Resultado objetivo específico 3 (Evaluar el desempeño de soportes de colágeno que contienen extracto de caléndula como implante en un modelo animal lagomorfo de heridas cutáneas de espesor total).

5.3.1 Seguimiento clínico de las heridas

Se comparó el cierre de 2 heridas contralaterales realizadas en la zona dorsal de cada animal, en cada herida se aplicaron 2 tratamientos (SC y SCAE), como control se realizaron heridas que cerraron por segunda intención (SI). Al séptimo día post cirugía en el momento del desbridamiento, se observó lo siguiente:

- **Heridas tratadas con SC:** Las heridas mostraron morfología plana, con bordes simples y nítidos, moderada exudación, formación de tejido de granulación. No se observaron signos visibles de procesos infecciosos, inflamatorios o zonas necróticas, acumulación de sangre o formación de hematomas y la degradación parcial del soporte fue evidente (**Figura 5-7, Panel A**). El análisis histológico del SC tomado de la herida en el momento del desbridamiento y cambio del soporte, indicó presencia de infiltrado celular y fibras de colágeno características de la microestructura original del soporte (**Figura 5-7, Panel B**).
- **Heridas tratadas con SCAE:** Se observó un lecho de herida sin presencia de exudados y sin evidencias de infección. En todos los casos se formó un coagulo en el lecho de la herida debajo del soporte que impidió su integración al lecho de la herida y su degradación (**Figura 5-7, Panel C**). El análisis histológico del SCAE tomado del lecho de la herida mostró el colapso de la microestructura y el crecimiento de células adheridas a su superficie (**Figura 5-7, Panel D**).

Es importante resaltar, que las heridas que cerraron por segunda intención (Control), mostraron características clínicas similares a las de las heridas tratadas con SCAE.

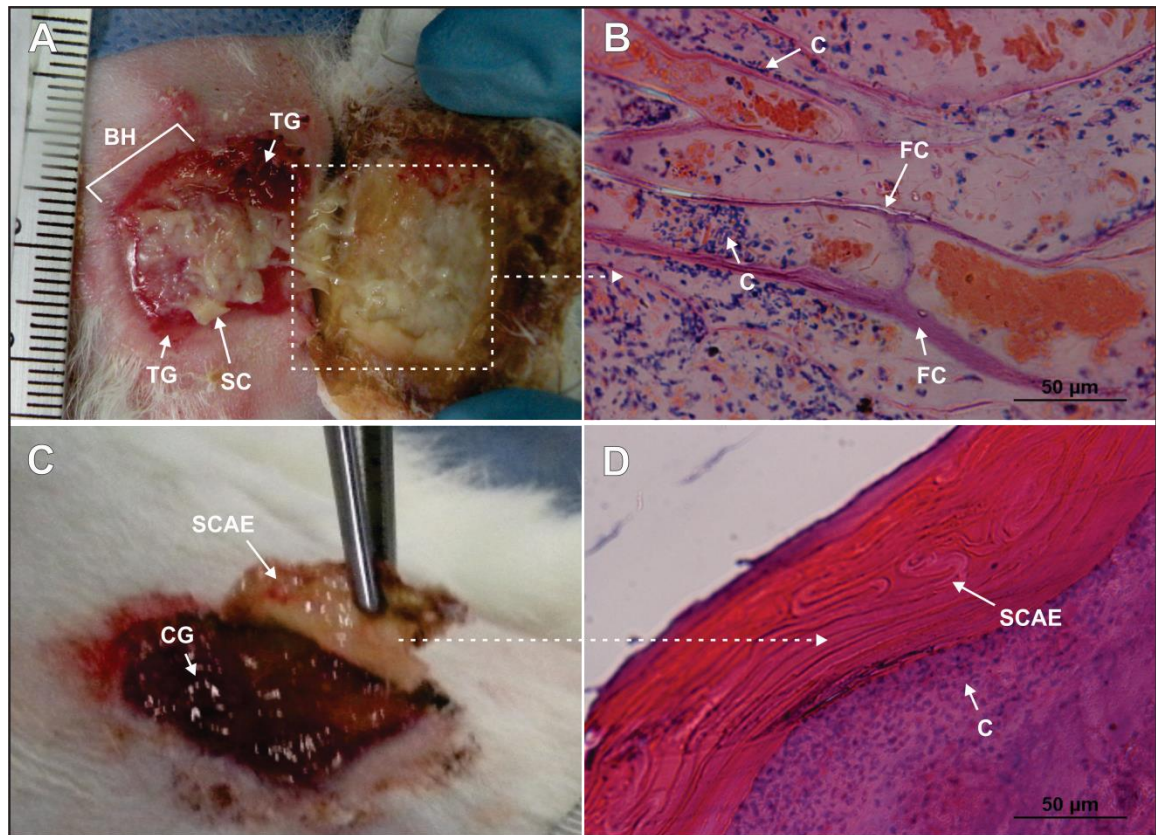


Figura 5-7. Desbridamiento de la herida tratada con soporte de colágeno y soporte de colágeno asociado a extracto de caléndula. **A.** Imágenes clínicas de la herida tratada con SC al séptimo día en el momento del desbridamiento. **B.** Tinción con H&E de los fragmentos de SC remanente en la herida. **C.** Imágenes clínicas de la herida tratada con SCAE. **D.** Tinción con H&E del SCAE desbridado de la herida. **SC:** Soporte de colágeno, **SCAE:** Soporte de colágeno asociado al extracto de caléndula, **BH:** Borde de la herida, **TG:** Tejido de granulación, **CG:** Coagulo, **FC:** Fibras de colágeno, **C:** Células.

A las 4 semanas del tratamiento quirúrgico en los animales tratados con SCAE se observó que las heridas tratadas y las heridas control cicatrizaron con bordes que se unieron generando una zona tirante y contraída, hipertrófica, de forma estrellada y con tonalidad rojiza, diferente a la de la piel sana circundante (**Figura 5-8, Panel A**). En los animales tratados con SC se encontraron cicatrices de forma redondeada y sin características hipertróficas o queloides. La tonalidad fue similar a la tonalidad de la piel sana circundante. Las características de las heridas que cerraron por segunda intención usadas como control en este grupo de animales fueron similares a las del grupo de conejos tratados con SCAE (**Figura 5-8, Panel B**). Por otro lado, en los animales usados para comparar la cicatrización de las heridas tratadas con SCAE o SC, se observó que estas últimas presentaron mejor apariencia clínica que las heridas tratadas con SCAE (**Figura 5-8, Panel C**).

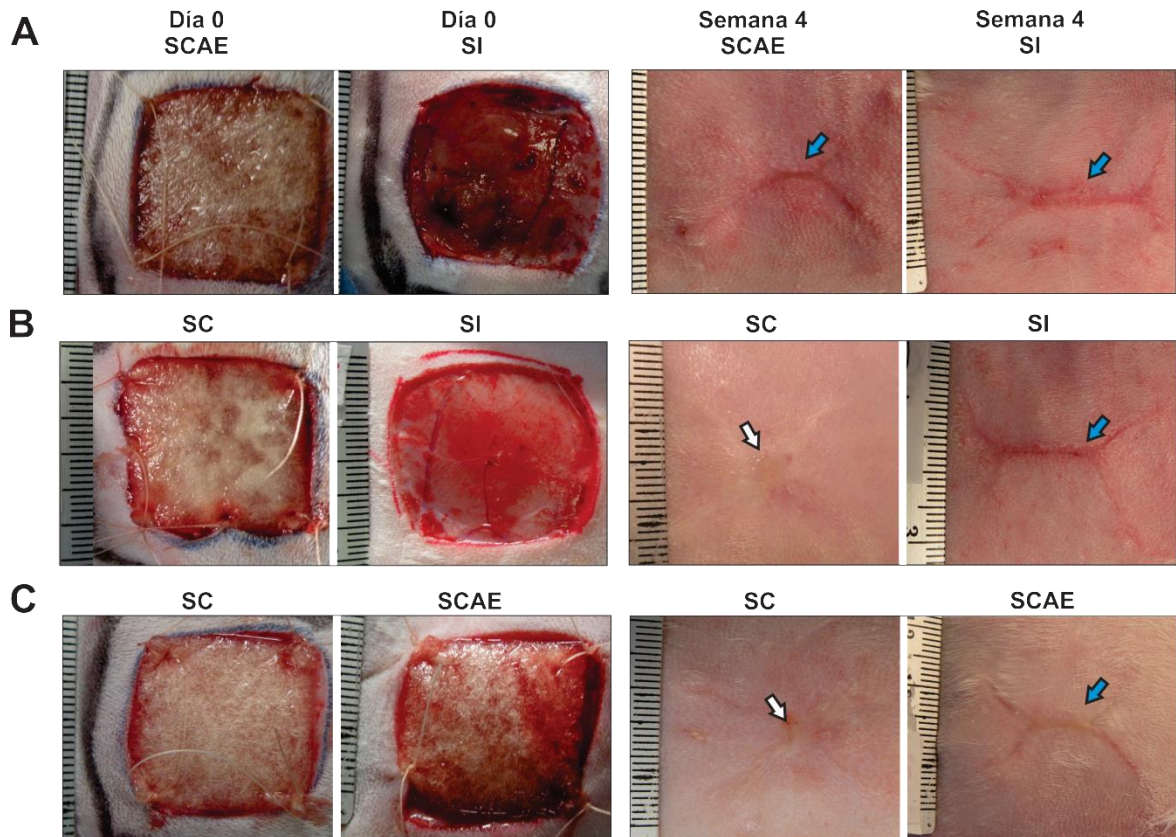


Figura 5-8. Imágenes clínicas representativas de las heridas después de los tratamientos en cada grupo. SC: Soportes de colágeno, **SCAE:** soportes de colágeno asociados al extracto de caléndula, **SI:** cierre por segunda intención. Las flechas azules indican la formación de cicatriz hipertrófica con morfología estrellada y coloración rojiza. Las flechas blancas indican un cierre de herida con cicatriz de coloración similar al tejido sano circundante y forma redondeada, con mejor aspecto clínico que la dejada cerrar por segunda intención o usando SCAE.

5.3.2 Análisis histomorfométrico del tejido

El análisis histomorfométrico del tejido formado en las heridas de piel sometidas a los diferentes tratamientos, incluyó la evaluación de: número de capas de epitelio, grosor del tejido conectivo, características de las fibras de colágeno, cantidad de células inflamatorias (inflamación) y cantidad de vasos (vascularización). En todos los casos los datos fueron normalizados con los datos obtenidos en la zona sana adyacente.

5.3.3 Número de capas del epitelio

La **Figura 5-9** muestra las imágenes histológicas representativas del epitelio formado en la zona tratada y en la zona sana adyacente (**Paneles A y B**, respectivamente). En los 3 tratamientos

evaluados, se observó un aumento en el número de capas del epitelio en la zona tratada con respecto a las capas presentes en el epitelio sano. La comparación del número de capas de epitelio formadas después de los tratamientos SC y SCAE y en el control SI, confirmó que no hay diferencias significativas en el número de capas epiteliales formadas luego del cierre de las heridas ($p > 0.05$) (**Figura 5-10**).

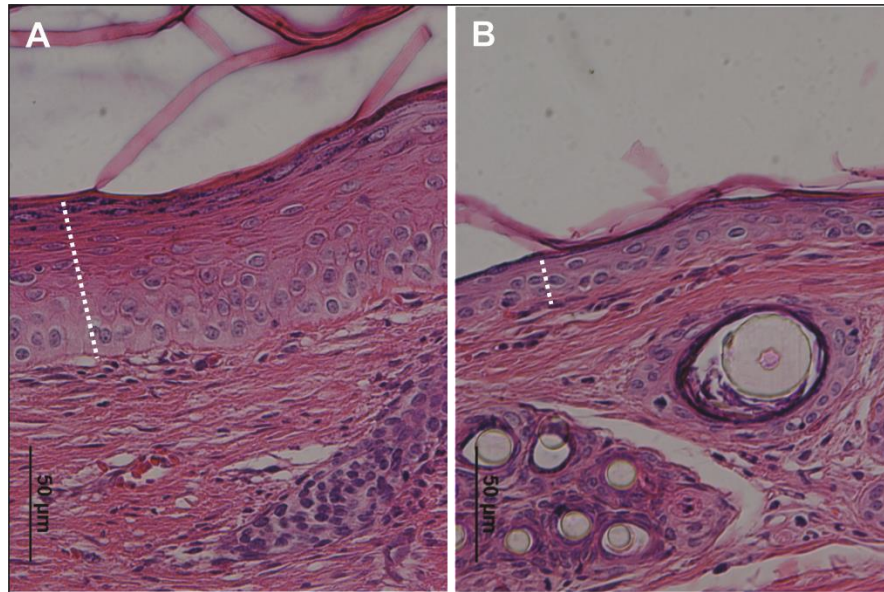


Figura 5-9. Corte histológico teñido con H&E del tejido obtenido después de los tratamientos. Capas de epitelio obtenidas al final del cierre (**B**). Capas de epitelio en tejido sano adyacente a la herida (**A**). La línea punteada indica la zona entre la membrana basal del epitelio (inicio de la diferenciación de los queratinocitos) y el estrato granuloso, donde se pueden observar los queratinocitos diferenciados en su forma plana.

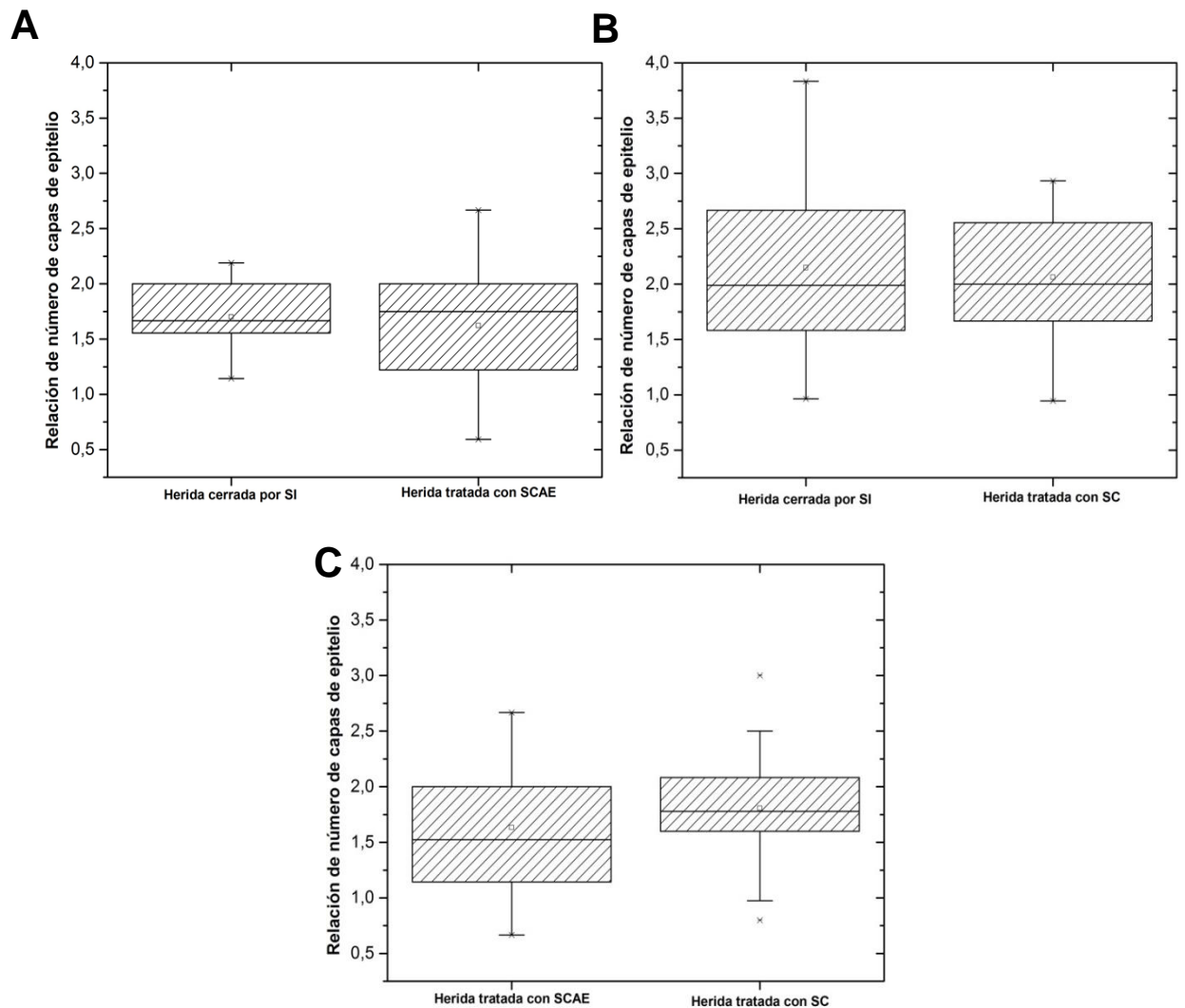


Figura 5-10. Relación de número de capas de epitelio obtenidas después del cierre de las heridas en cada grupo. No se observaron diferencias significativas en el número de capas de epitelio de los animales tratados con SCAE *vs* SI ($p=0,1526$) (**A**), los animales tratados con SC *vs* SI ($p=0,6982$) (**B**) y los animales tratados con SCAE *vs* SC ($p=0,2606$).

5.3.4 Grosor del tejido conectivo

El tejido conectivo formado en las lesiones después de aplicar los tratamientos, no presentó glándulas ni folículos pilosos. En las heridas control y en las heridas tratadas con SCAE, se observó reducción significativa del grosor del tejido conectivo con respecto al tejido conectivo sano circundante. Llama la atención el hecho de que en las heridas que recibieron SC, el grosor del epitelio fue similar al del tejido sano y significativamente diferente al formado en las heridas control y en las heridas tratadas con SCAE (Figuras 5-11 y 5-12).

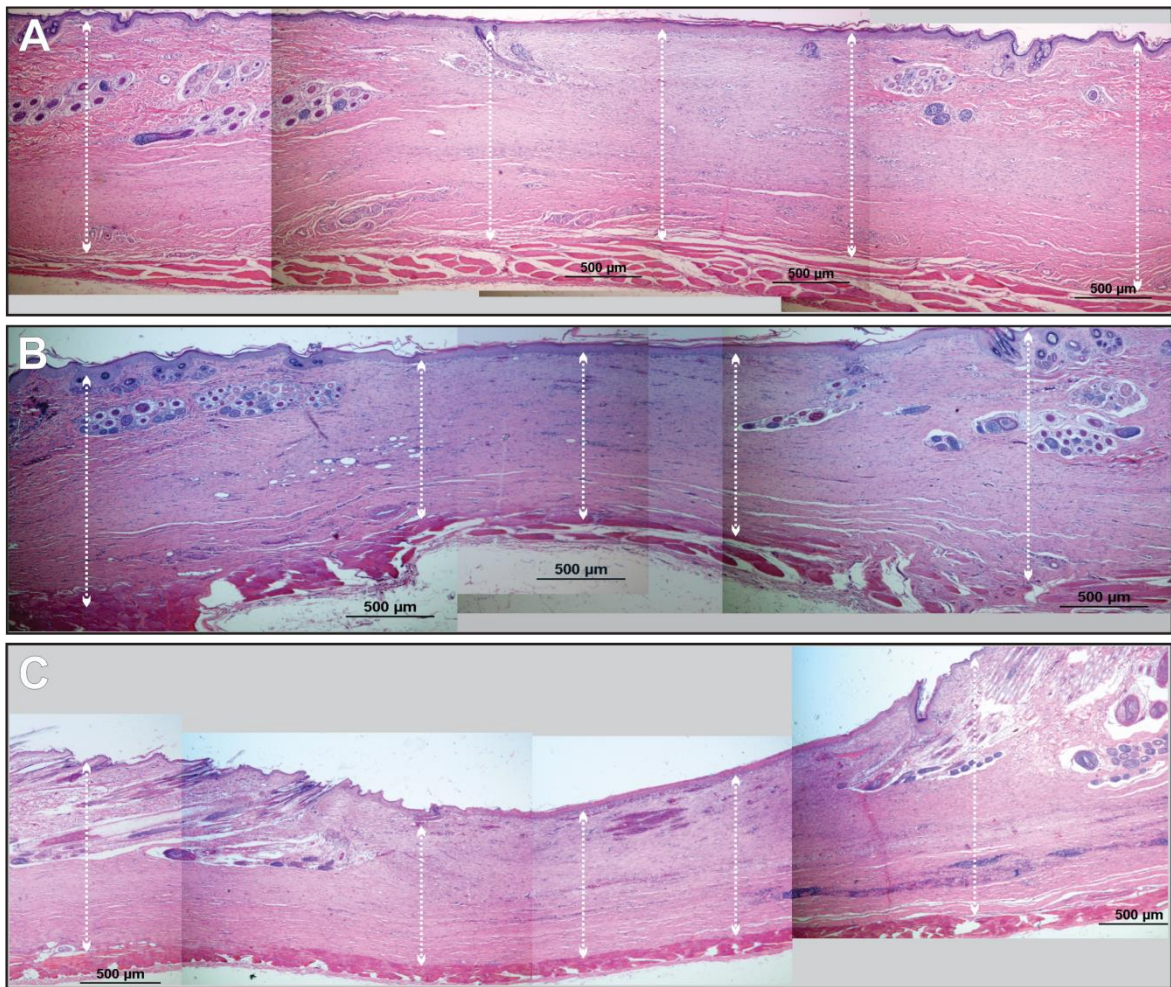


Figura 5-11. Cortes histológicos y tinción con H&E del tejido obtenido después del cierre. Imágenes histológicas representativas del grosor del tejido conectivo obtenido después del tratamiento. SC (A). SCAE (B) y control SI (C). Las flechas en la imagen indican las mediciones en μm realizadas desde la parte superior del tejido muscular subyacente a la dermis, hasta la membrana basal de la epidermis.

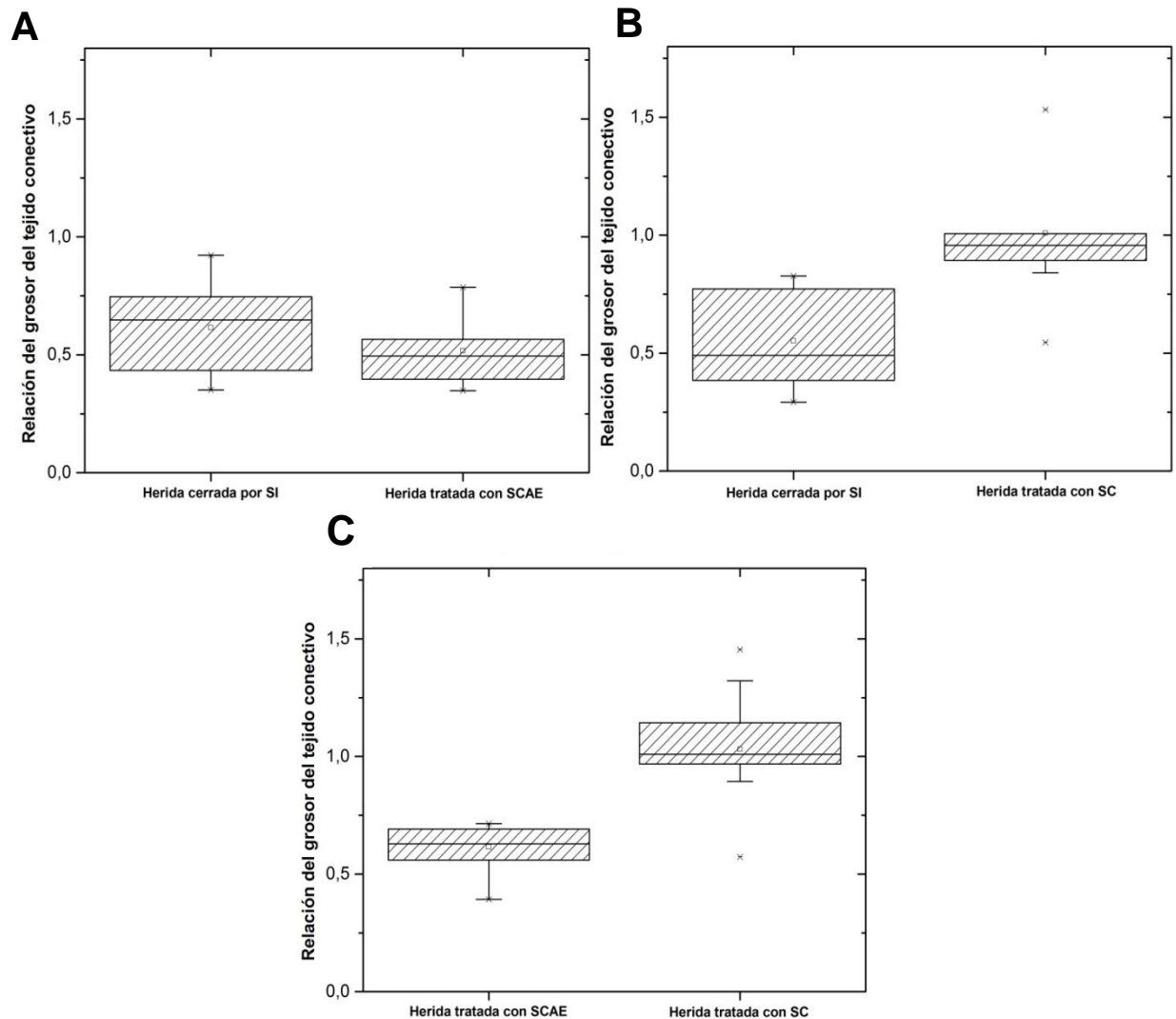


Figura 5-12. Relación de grosor del tejido conectivo después del tratamiento en cada grupo. No se observaron diferencias significativas en el grosor del tejido conectivo de los animales tratados con SCAE *vs* SI ($p=0,2021$) **(A)**, el grosor del tejido conectivo fue significativamente mayor en los animales tratados con SC *vs* SI ($p=0,0070$) **(B)**, el grosor del tejido conectivo fue significativamente mayor en los animales tratados con SC *vs* SCAE ($p=0,0134$) **(C)**.

5.3.5 Disposición de las fibras de colágeno

En el tejido formado en todas las heridas se observaron 3 tipos de disposición de fibras de colágeno: fibroso y paralelo al eje del epitelio con fibroblastos totalmente alargados (**Figura 5-13, Panel A**), fibroso y aleatorio con fibroblastos de forma menos alargada (**Figura 5-13, Panel B**), laxo y paralelo al eje del epitelio con fibroblastos de forma menos alargada (**Figura 5-13, Panel C**). En ningún caso se observó tejido con fibras densas. La zona sana adyacente a la herida presentó un tejido

fibroso y aleatorio con fibras de colágeno maduras y menor contenido de células que los tejidos nuevos obtenidos después de cada tratamiento (**Figura 5-13, Panel D**).

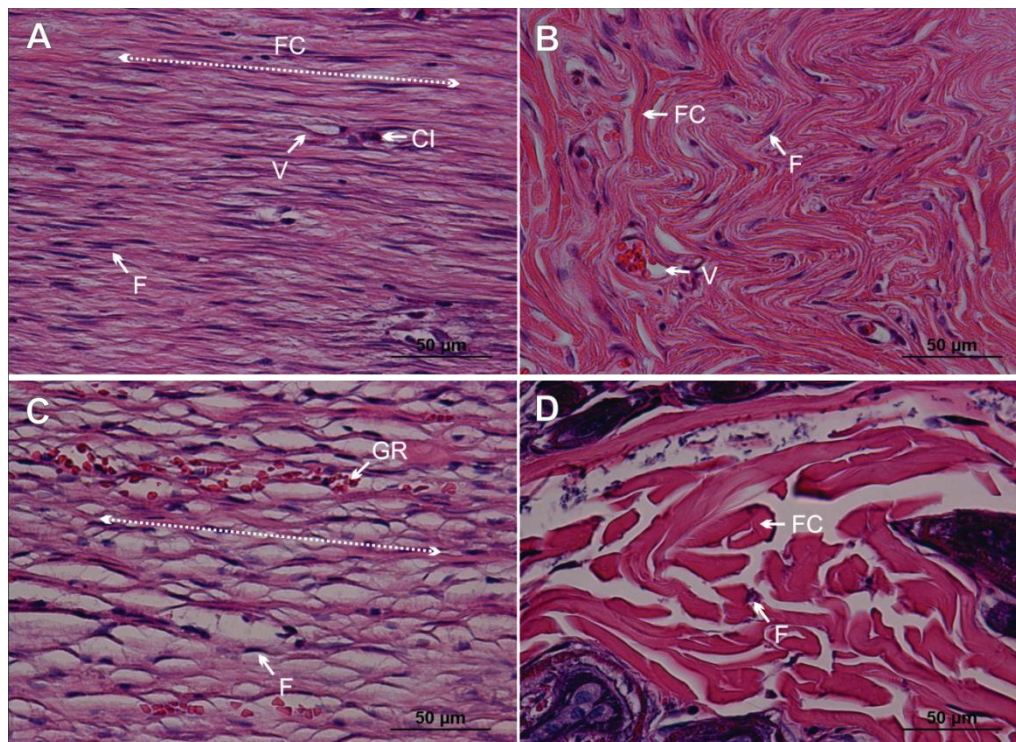


Figura 5-13. Disposición de las fibras de colágeno del tejido obtenido después de los tratamientos en cada grupo y en la zona sana adyacente. A. Fibroso y paralelo al eje del epitelio **B.** Fibroso y aleatorio. **C.** Laxo y paralelo al eje del epitelio. **D.** Tejido fibroso y aleatorio del tejido sano adyacente. Las flechas punteadas indican la direccionalidad del tejido. **FC:** Fibras de colágeno, **F:** Fibroblastos, **GR:** Glóbulos rojos, **V:** Vaso, **CI:** Células inflamatorias

Se debe resaltar que las heridas tratadas con SCAE y SI mostraron mayor porcentaje de tejido fibroso y de orientación paralela (35,71%), que las heridas tratadas con SC (28,57%) (**Figura 5-14, Panel A**). Por otro lado, en las heridas tratadas con SC se observaron fibras con orientación más parecida a la orientación de las fibras del tejido sano y más fibras dispuestas en haces aleatorios (48,72%) que en las heridas tratadas con SCAE (28,21%) o SI (23,08%) (**Figura 5-14, Panel B**). Las heridas que cerraron por segunda intención (SI) presentan más fibras laxas y de orientación paralela (50%) que las heridas tratadas con SC (28,57 %) y SCAE (21,53%) (**Figura 5-14, Panel C**).

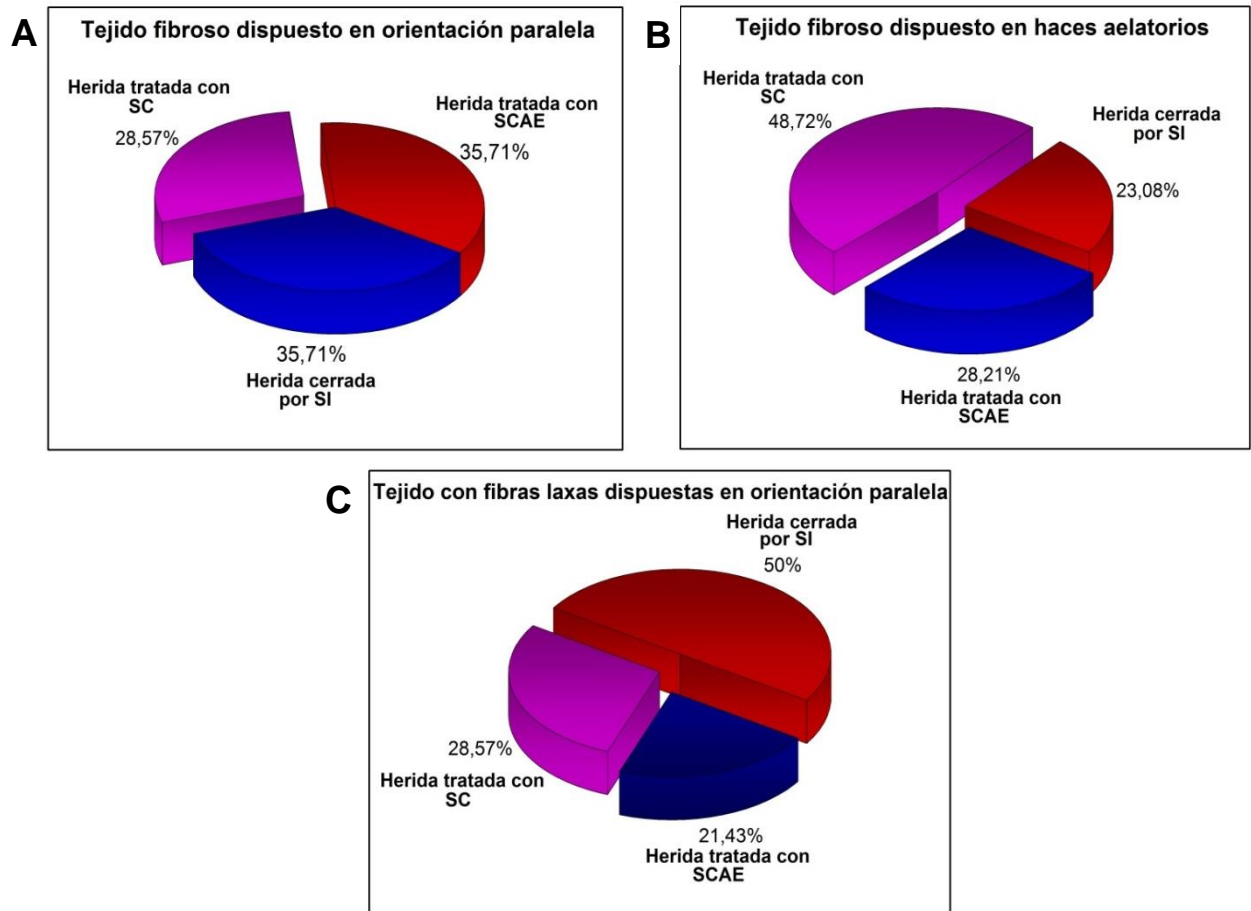


Figura 5-14. Agrupación de las fibras encontradas de acuerdo a las características observadas en los análisis histológicos de las heridas tratadas y el control. A. Distribución de porcentaje de tejido fibroso paralelo. **B.** Distribución de porcentaje de tejido fibroso y aleatorio. **C.** Distribución de porcentaje de tejido laxo y paralelo.

5.3.6 Vascularización e inflamación

La evaluación de la cantidad de vasos y células inflamatorias encontradas indica que las heridas realizadas en los animales fueron agudas y de resolución normal; ningún animal presentó heridas crónicas generadas por procesos infecciosos acompañados de una respuesta inflamatoria. No hubo diferencias significativas en el número de células inflamatorias presentes en el tejido cicatrizal de las heridas sujetas a los 3 tratamientos ($p > 0.05$) (**Figura 5-15**). El promedio de células inflamatorias fue menor a 10 células/campo, lo cual coincide con la categoría de inflamación nula según la escala de inflamación descrita en Materiales y Métodos [66]. Aunque hay menos de 10 células inflamatorias en el tejido restaurado, cuando éste valor se compara con el del tejido sano adyacente hay entre 1 y 8 veces más células inflamatorias en la zona reparada.

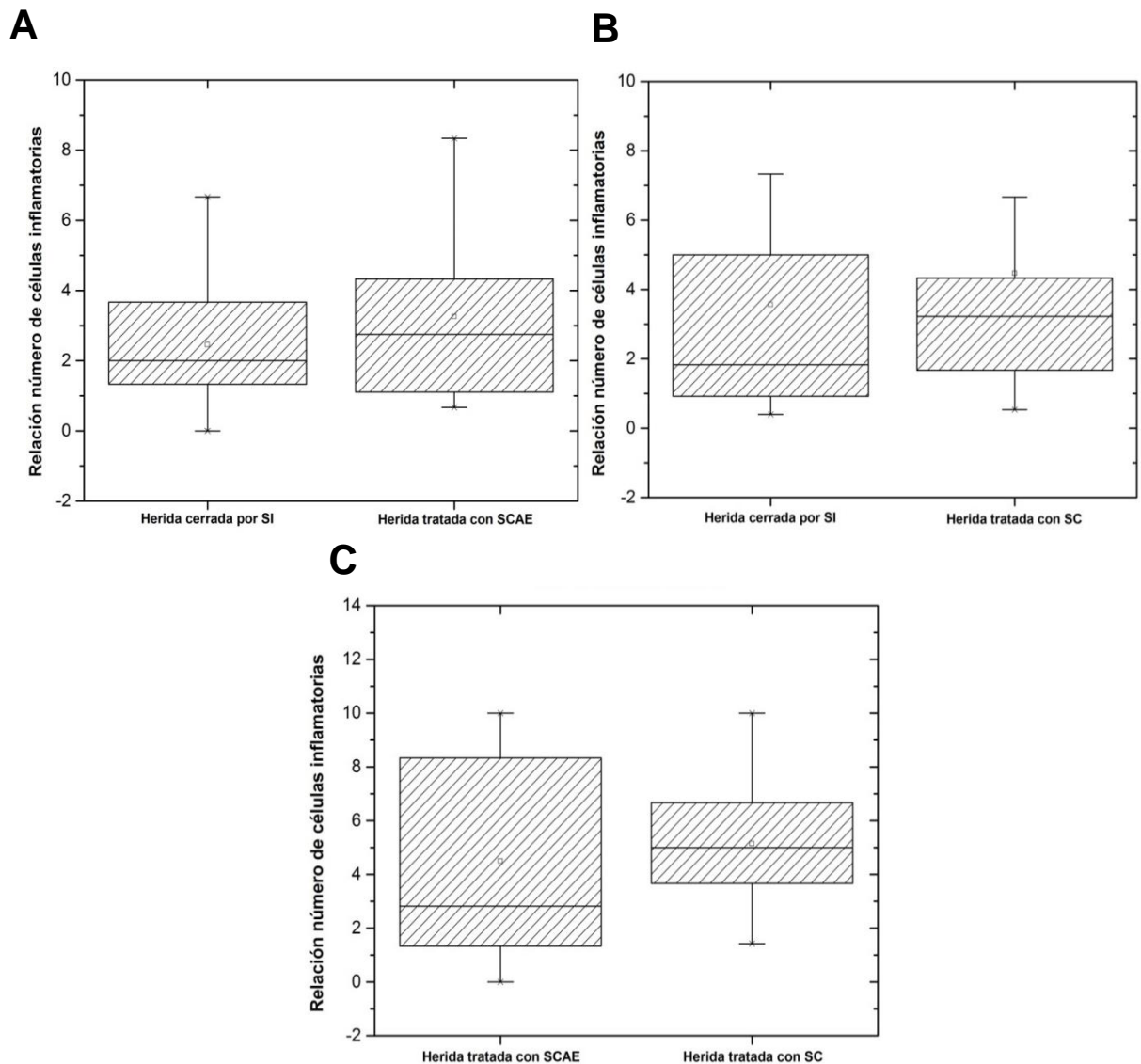


Figura 5-15. Relación de número de células inflamatorias después del cierre en cada grupo. No se observaron diferencias significativas en número de células inflamatorias en el tejido obtenido después del tratamiento con SCAE vs SI ($p=0,6571$) **(A)**, SC vs SI ($p=0,3156$) **(B)**, y SC vs SCAE ($p=0,5071$) **(C)**.

La **Figura 5-16** muestra el análisis del número de vasos de los tejidos formados en cada uno de los 3 tratamientos evaluados. El número de vasos fue casi el doble del número de vasos sanguíneos del tejido sano adyacente, sin diferencias significativas entre los grupos evaluados, además, no se observó congestión vascular o hemorragias focales.

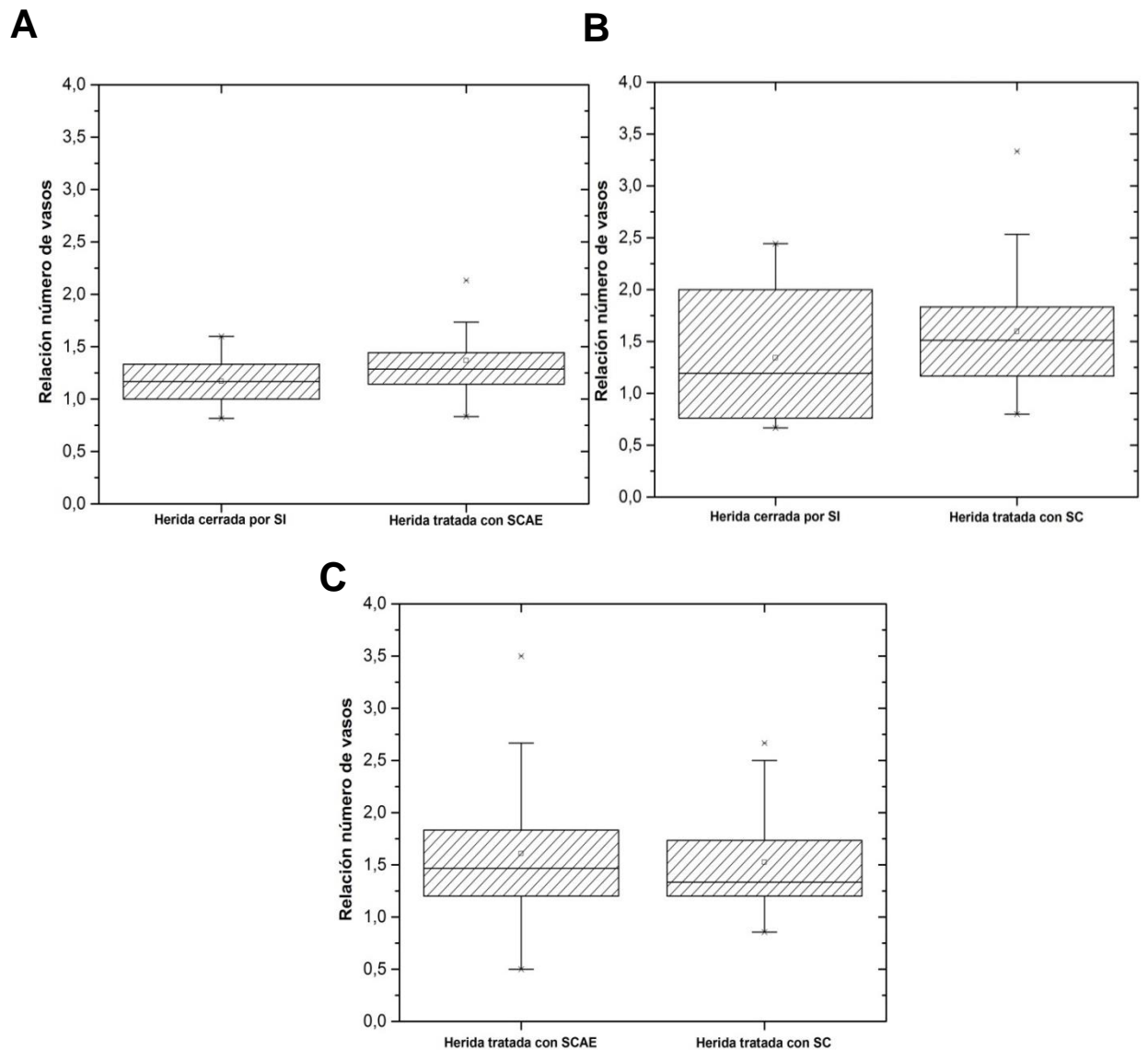


Figura 5-16. Relación de número de vasos sanguíneos después del cierre de la herida en cada grupo. No se observaron diferencias significativas en número vasos sanguíneos en el tejido obtenido después del tratamiento con SCAE vs SI ($p=0,5027$) **(A)**, SC vs SI ($p=0,0979$) **(B)**, y SC vs SCAE ($p=0,4886$) **(C)**.

6. Discusión

La incursión de la ingeniería de tejidos como alternativa terapéutica en la reparación y reemplazo de tejidos y órganos dañados o perdidos, ha llevado a reevaluar el concepto de biocompatibilidad [27, 40]. En la ingeniería de tejidos, la biocompatibilidad de un material no solo depende de las características químicas y físicas del mismo sino del sitio en el cual va a ser implantado; por tal motivo, su aplicación requiere que el material reaccione bioactivamente con el tejido adyacente, en lugar de ser inerte e ignorado por este; además, es necesario que el material se recambie. Por lo tanto, el concepto de biocompatibilidad en ingeniería de tejidos, hace referencia a que el dispositivo debe estimular una respuesta apropiada en el lecho de la herida con el fin de inducir regeneración, reemplazo o reparación, optimizando de esta manera la terapia, sin producir efectos adversos sistémicos o locales [40].

La evaluación de la biocompatibilidad de los productos de ingeniería de tejidos, incluye métodos *in vitro* e *in vivo*; entre estos, ensayos de citotoxicidad, respuesta alérgica, inflamación, mutagénesis/carcinogénesis, ensayos de biofuncionalidad y biotolerabilidad [40, 67, 68]. En este trabajo se evaluó *in vitro* e *in vivo* la biocompatibilidad de soportes de colágeno tipo I modificados con microesferas de gelatina-colágeno [64] y asociados a un extracto hidroglicólico de flores de caléndula. En esta evaluación se incluyeron soportes de colágeno tipo I modificados con las microesferas y sin asociar al extracto, como control.

Dentro de los métodos *in vitro* empleados para evaluar la biocompatibilidad se siguieron los lineamientos establecidos por la norma ISO10993-5 y por la USP 36 <87>[62, 63], para determinar citotoxicidad y reactividad biológica, respectivamente. En los ensayos de citotoxicidad se evaluó el metabolismo y la morfología de células L929 y fibroblastos primarios de piel de conejo en contacto con diluciones del extracto de caléndula, para determinar la concentración de extracto que se podía asociar con el soporte; así como, la citotoxicidad inducida luego de su asociación.

Con las 2 metodologías *in vitro* empleadas se encontró que la citotoxicidad observada en los 2 tipos de células expuestas al extracto de caléndula, es función de su concentración. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por *Fonseca. Y, et al. 2010* y *Matysik. G, et al. 2005*, quienes mostraron que el extracto hidroalcoholico de caléndula a bajas concentraciones estimula la proliferación de fibroblastos, pero a mayores concentraciones puede ser tóxico [69, 70]. No se encontró información acerca del metabolito o metabolitos secundarios responsables de la citotoxicidad del extracto. En consecuencia debido a que la actividad biológica del extracto se debe a la mezcla compleja de estos metabolitos, no se estudió su biocompatibilidad de manera independiente.

Las células primarias aisladas de la piel de conejo fueron más susceptibles al contacto con el extracto de caléndula, ya que todas murieron cuando fueron expuestas a una concentración del extracto del 1% v/v. Contrariamente, la línea celular L929 en esa misma concentración mostró un porcentaje de viabilidad del 60%. Estudios comparativos realizados con células primarias y líneas celulares muestran que aunque las células primarias exhiben morfología similar a las células de los tejidos de los cuales son tomadas, presentan disminución en la reproducibilidad de los resultados ya que son más sensibles a los efectos tóxicos, tienen baja homogeneidad y una tendencia a la pérdida de especialización o diferenciación bajo condiciones de cultivo [71]. Por otra parte, las líneas celulares aunque son diferentes al tejido original, en estudios *in vitro* han mostrado ser menos sensibles a los efectos tóxicos y proporcionar resultados más reproducibles y homogéneos [71].

En éste trabajo se decidió asociar una concentración de 1%v/v de extracto de caléndula al soporte modificado con las microesferas de gelatina-colágeno, ya que la inclusión de las microesferas permitió que éste se comportara como un sistema de liberación controlado [64]. La norma ISO 10993-5 considera que un dispositivo médico es potencialmente citotóxico si la viabilidad celular es menor al 70% con respecto al blanco [62]. A pesar de que los porcentajes de viabilidad de la línea celular L929 (60%) y de los fibroblastos de piel de conejo (0%) expuestos al 1%v/v de extracto de caléndula estuvieron por debajo de éste valor, los porcentajes de viabilidad de las células expuestas el extracto asociado al soporte modificado fueron superiores al 70% y cualitativamente se observaron fibroblastos primarios metabólicamente activos dentro del soporte modificado con las microesferas de gelatina-colágeno cargado con 1%v/v de extracto de caléndula. Lo anterior, indica que éste está controlando la liberación de los componentes del extracto impidiendo que se liberen concentraciones mayores o iguales al 1%. Los datos provenientes de estos ensayos *in vitro*, indican que el sistema soporte- extracto de caléndula es seguro bajo condiciones experimentales controladas, sin embargo, deben realizarse más estudios biológicos para evaluar su seguridad en el tratamiento de heridas agudas y crónicas *in vivo* y para su posterior uso en este tipo de heridas en humanos.

Además de los ensayos de citotoxicidad y reactividad biológica *in vitro*, se evaluó la bioactividad del soporte *in vivo*. Los análisis histológicos de los fragmentos de los soportes retirados en el desbridamiento y las observaciones del seguimiento clínico de las heridas, muestran que la microestructura del soporte de colágeno asociado al extracto (SCAE) colapsó después de ser implantado en la herida. Esta disrupción de la microestructura impidió la migración y proliferación celular al interior del soporte, impidiendo su integración al lecho de la herida. Además, el SCAE no se degradó y se observó rígido y deshidratado; características que sugieren su baja bioactividad. Lo anterior puede deberse a que sus propiedades mecánicas y de superficie, velocidad de degradación y características microestructurales (tamaño de poro, interconectividad y porosidad) fueron modificadas por la asociación con el extracto. Por el contrario, los soportes de colágeno que no incluyeron extracto (SC) mantuvieron su microestructura y permitieron la adhesión y migración celular a través de los poros del soporte; igualmente, la observación clínica mostró que fueron degradados a medida que se formaba tejido de granulación y exudado en la herida. El conjunto de estos resultados demuestra la bioactividad de SC, ya que las características del mismo están acordes con las reglas establecidas para un producto bioactivo que induzca regeneración [12].

En las heridas tratadas con SCAE clínicamente se observaron cicatrices hipertróficas caracterizadas por la presencia de relieve, coloración rojiza y morfología estrellada, similares a las de las heridas que cerraron por segunda intención, sugiriendo la baja bioactividad del producto evaluado [72]. Contrariamente, en las heridas tratadas con los soportes sin extracto se formaron cicatrices con tonalidad parecida a la del tejido sano y con mejor apariencia clínica, resultados que se aproximan a las características ideales de un sustituto dérmico [12, 44].

Cuando se evaluó histológicamente el tejido cicatrizal, en todos los tratamientos la epidermis presentó hiperplasia celular; observándose hasta 2,5 veces más capas de queratinocitos que en el tejido sano circundante. Estos resultados son similares a los reportados por *Butler. C, et al. 1999* quienes al injertar soportes de colágeno y glicosaminoglicanos cultivados o no con queratinocitos en cerdos de raza Yorkshire, encontraron que hay una estimulación inicial de las células epiteliales con inducción de hiperplasia al día 14, que desaparece en el día 20 [73]. El análisis histológico presentado en ésta tesis fue realizado en conejos, no se realizó seguimiento luego del cierre de herida y formación de cicatriz, en consecuencia es posible que la hiperplasia observada disminuya con el tiempo.

La mayor diferencia entre los tratamientos al final del cierre fue el grosor del tejido conectivo y la disposición de las fibras de colágeno. En las heridas tratadas con SCAE, el tejido conectivo fue más

delgado y las fibras de colágeno se orientaron paralelas a la epidermis; lo mismo se observó en las heridas que cerraron por segunda intención. En las heridas tratadas con SC, el tejido conectivo fue similar en grosor y en la orientación aleatoria de las fibras de colágeno al tejido sano adyacente a la herida. Estos resultados sugieren que SC induce regeneración parcial debido a que las fibras de colágeno, sintetizadas por las células que migran desde el lecho de la herida, se orientan de manera aleatoria como se observa en la dermis normal [74, 75]. Aunque SCAE no mejoró el proceso de reparación, no se observaron efectos adversos al emplearlo como injerto, ya que no hubo infección, ni inflamación.

La baja biocompatibilidad de los SCAE, puede ser explicada por la presencia del extracto. Teniendo en cuenta que la diferencia entre los 2 tipos de soportes evaluados es la presencia del extracto, es posible que los metabolitos (entre estos los polifenoles) presentes en el extracto aumenten el entrecruzamiento de los soportes que lo contienen, impidiendo la migración y la adhesión de las células y disminuyendo su degradación. Estudios realizados por otros grupos, han mostrado que el empleo de derivados de productos polifenólicos como los ácidos tanínicos (pentagaloil glucosa, PGG), aumenta la resistencia de soportes de elastina obtenidos al descelularizar arterias carótidas porcinas a la degradación con elastasas [76]. Adicionalmente, se ha reportado que mediante interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno los polifenoles se unen a proteínas, especialmente colágeno y elastina que presentan numerosos residuos de prolina, estabilizándolas [76, 77].

Flavonoides presentes en el extracto de caléndula, como las catequinas y sus productos de oxidación, le otorgan estabilidad térmica al colágeno, protegiéndolo contra el ataque de las colagenasas e impidiendo su desestabilización estructural por agentes químicos como la urea [78, 79]. De igual manera, la catequina y su subproducto epigallocatequin galato (EGCG) se une a la colagenasa y cambian su estructura impidiendo la degradación del colágeno [80]. Estos mecanismos de acción están implicados en el desarrollo de enfermedades como fibrosis en la submucosa oral en personas que consumen tradicionalmente la nuez de betel (*Areca catechu*), principalmente en la India, Pakistan y Sur Este de Asia; los metabolitos de esta nuez inducen una enfermedad crónica caracterizada por presentar una atrofia epitelial y acumulación de colágeno en cicatrices de la mucosa oral [81].

Ésta tesis sugiere que la diferencia presentada entre los 2 sustitutos evaluados obedece a los metabolitos presentes en el extracto de caléndula los cuales influyen en la biocompatibilidad de SCAE, impidiendo su integración y degradación.

7. Conclusiones

- Los soportes de colágeno modificados con microesferas de gelatina-colágeno son seguros *in vitro* y mejoran *in vivo* las características clínicas de la apariencia de la cicatriz, indicativo de su biocompatibilidad.
- Los soportes de colágeno modificados con microesferas de gelatina-colágeno asociados al extracto de caléndula (1%v/v) son seguros *in vitro* bajo condiciones experimentales controladas, sin embargo, deben realizarse más estudios biológicos para evaluar su seguridad en el tratamiento de heridas agudas y crónicas *in vivo* y para su posterior uso en este tipo de heridas en humanos.
- La biocompatibilidad de los soportes de colágeno tipo I disminuye cuando se asocian a un extracto hidroglicólico de flores de caléndula, probablemente debido a que sus metabolitos (polifenoles), los estabilizan afectando su degradación y por ende su biocompatibilidad.
- Los soportes de colágeno tipo I sin asociar al extracto, inducen regeneración parcial de heridas de piel de espesor total de conejo porque propician la formación de tejido orientado aleatoriamente, de manera similar a como se orienta en la dermis sana.

8. Recomendaciones

- Evaluar mediante degradación enzimática los soportes de colágeno asociados al extracto de caléndula
- No entrecruzar el soporte antes de su asociación al extracto y caracterizar las propiedades mecánicas, microestructurales y de degradación luego de su asociación.
- Hacer estudio histológico en el tiempo para evaluar cambios en las características histológicas del tejido luego de su cierre.

9. Bibliografía

- [1] Cormane J, Rodelo A. Epidemiología del cáncer no melanoma en Colombia. *Rev Asoc Colomb Dermatol* 2014;22:20-6.
- [2] http://www.cancer.gov.co/~incancer/instituto/inc_estadisticas/graficos/exportar.php?id_esta=3&id_con t=2¶=¶2=¶3=.
- [3] https://www.fpv.org.co/uploads/documentos/libreria/anuario_2011_pagina.pdf.
- [4] Espinosa L, Sosnik A, Fontanilla MR. Development and preclinical evaluation of acellular collagen scaffolding and autologous artificial connective tissue in the regeneration of oral mucosa wounds. *Tissue engineering Part A* 2010;16:1667-79.
- [5] Fontanilla MR, Espinosa LG. In vitro and in vivo assessment of oral autologous artificial connective tissue characteristics that influence its performance as a graft. *Tissue engineering Part A* 2012;18:1857-66.
- [6] Suesca E. Optimización de la obtención de soportes de colágeno y estudio del efecto de su microestructura en el desarrollo de mucosa oral artificial: Universidad Nacional de Colombia; 2013.
- [7] Reuter J. Botanicals in dermatology and skin health. 2009; New Rochelle, NY. USA: Mary Ann Liebert Inc. 33-65.
- [8] Schmidt C, Fronza M, Goettert M, Geller F, Luik S, Flores EM, et al. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *Journal of ethnopharmacology* 2009;122:523-32.
- [9] <http://web.invima.gov.co/portal/faces/index.jsp?id=1250>.
- [10] Zea G. Evaluación de soportes de colágeno tipo I como un sistema de entrega para la liberación de un extrato de Caléndula (*Calendula officinalis*). Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia; 2012.
- [11] Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of international medical research* 2009;37:1528-42.
- [12] Yannas IV. Emerging rules for inducing organ regeneration. *Biomaterials* 2013;34:321-30.
- [13] Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz JT, Gbureck U, Rackwitz L, Noth U, et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced drug delivery reviews* 2013;65:581-603.
- [14] Lee SH, Jeong SK, Ahn SK. An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J* 2006;47:293-306.
- [15] Fawcett B. Tratado de Histología. 12 ed 1995.
- [16] Schulz JT, 3rd, Tompkins RG, Burke JF. Artificial skin. *Annu Rev Med* 2000;51:231-44.
- [17] Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 2005;15:599-607.
- [18] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008;453:314-21.
- [19] Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738-46.
- [20] Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16:585-601.
- [21] Wong T, McGrath JA, Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *The British journal of dermatology* 2007;156:1149-55.
- [22] Yannas IV. Similarities and differences between induced organ regeneration in adults and early foetal regeneration. *J R Soc Interface* 2005;2:403-17.

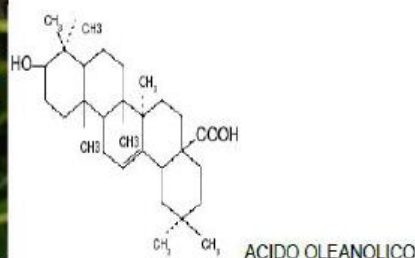
- [23] Enoch S, Leaper J. Basic science of wound healing. *Basic Science* 2005;23:37-42.
- [24] Atala A. Engineering organs. *Current Opinion in Biotechnology* 2009;20:575-92.
- [25] Yang X, Chen B, Liu T, Chen X. Reversal of myofibroblast differentiation: A review. *European journal of pharmacology* 2014;734C:83-90.
- [26] Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 2002;3:349-63.
- [27] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-6.
- [28] Metcalfe AD, Ferguson MW. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface* 2007;4:413-37.
- [29] Nair R, Sevukarajan M, Mohammed T, Kumar A. Collagen based drug delivery systems: a review. *JTPS* 2010;1:288-304.
- [30] Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1531-46.
- [31] Matarasso SL. The use of injectable collagens for aesthetic rejuvenation. *Seminars in cutaneous medicine and surgery* 2006;25:151-7.
- [32] Sauerbier S, Gutwald R, Wiedmann-Al-Ahmad M, Lauer G, Schmelzeisen R. Clinical application of tissue-engineered transplants. Part I: mucosa. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:625-32.
- [33] Kumar MS, Kirubanandan S, Sripriya R, Sehgal PK. Triphala incorporated collagen sponge--a smart biomaterial for infected dermal wound healing. *The Journal of surgical research* 2010;158:162-70.
- [34] Dumitrescu AL. Bone Grafts and Bone Graft Substitutes in Periodontal Therapy. *Chemicals in Surgical Periodontal Therapy: Springer Berlin Heidelberg*; 2011. p. 73-144.
- [35] Yannas IV, Tzeranis DS, Harley BA, So PT. Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization. *Philosophical transactions Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 2010;368:2123-39.
- [36] Rastogi S, Modi M, Sathian B. The efficacy of collagen membrane as a biodegradable wound dressing material for surgical defects of oral mucosa: a prospective study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2009;67:1600-6.
- [37] Aigner T, Stove J. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Advanced drug delivery reviews* 2003;55:1569-93.
- [38] Buma P, van Tienen T, Veth R. The collagen meniscus implant. *Expert Rev Med Devices* 2007;4:507-16.
- [39] Wangenstein KJ, Kallianen LK. Collagen tube conduits in peripheral nerve repair: a retrospective analysis. *Hand* 2010;5:273-7.
- [40] Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008;29:2941-53.
- [41] Lee SS, Sharma AR, Choi BS, Jung JS, Chang JD, Park S, et al. The effect of TNF α secreted from macrophages activated by titanium particles on osteogenic activity regulated by WNT/BMP signaling in osteoprogenitor cells. *Biomaterials* 2012;33:4251-63.
- [42] Ingham E, Fisher J. The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials* 2005;26:1271-86.
- [43] Soller EC, Tzeranis DS, Miu K, So PT, Yannas IV. Common features of optimal collagen scaffolds that disrupt wound contraction and enhance regeneration both in peripheral nerves and in skin. *Biomaterials* 2012;33:4783-91.
- [44] Yannas IV, Lee E, Orgill DP, Skrabut EM, Murphy GF. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989;86:933-7.
- [45] Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology* 2008;20:86-100.
- [46] Halim AS, Khoo TL, Mohd Yusof SJ. Biologic and synthetic skin substitutes: An overview. *Indian journal of plastic surgery : official publication of the Association of Plastic Surgeons of India* 2010;43:S23-8.
- [47] Jones I, Currie L, Martin R. A guide to biological skin substitutes. *Br J Plast Surg* 2002;55:185-93.
- [48] http://www.ahrq.gov/research/findings/ta/skinsubs/HCPR0610_skinsubst-final.pdf.
- [49] Bello SA, Fontanilla MR. Desarrollo y caracterización de tejido conectivo artificial de mucosa oral. (Memorias II Congreso Nacional de Investigación y Salud). *Biomédica* 2002;22 77. .

- [50] Bello SA, Pereria R, Fontanilla MR. Elaboración de tejido conectivo artificial autólogo de mucosa oral y evaluación de su desempeño como cobertura biológica en lesiones mucosas inducidas en conejos. *Revista de la Federación Odontológica Colombiana* 2004;20:20-41.
- [51] Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Spallino A, Falchi M, Bertelli A, et al. Antioxidant activity of *Calendula officinalis* extract: inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Pharmacology* 2009;83:348-55.
- [52] Basch E, Bent S, Foppa I, Haskmi S, Kroll D, Mele M, et al. Marigold (*Calendula officinalis* L.): an evidence-based systematic review by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal of herbal pharmacotherapy* 2006;6:135-59.
- [53] Preethi KC, Kuttan G, Kuttan R. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Indian journal of experimental biology* 2009;47:113-20.
- [54] Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytother Res* 2003;17:599-604.
- [55] Jimenez-Medina E, Garcia-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer* 2006;6:119.
- [56] Pommier P, Gomez F, Sunyach MP, D'Hombres A, Carrie C, Montbarbon X. Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004;22:1447-53.
- [57] Tabatabai NR, Miri N, Shafiei MR, Tabandeh A, Oryan A, Nazifi S. Effects of topical application of *Calendula officinalis* gel on collagen and hydroxyproline content of skin in rats. *Comparative Clinical Pathology* 2010.
- [58] Chandran PK, Kuttan R. Effect of *Calendula officinalis* Flower Extract on Acute Phase Proteins, Antioxidant Defense Mechanism and Granuloma Formation During Thermal Burns. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 2008;43:58-64.
- [59] Donovan JaB, P. . *Current Protocols in Immunology*. Section I Animal Health and Husbandry. Unit 1.4 Anesthesia. 1995.
- [60] Donovan JaB, P. *Current Protocols in Immunology*. Section II Use of Mouse, Rat, Hamster, and Rabbit. Unit 1.7 Blood Collection. 1995:56.
- [61] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 1985;150:76-85.
- [62] 10993-5 IOFSI. ISO 2009.
- [63] <87> Brtiv. US Pharmacopeia. Rockville, MD USP 2013. p. 1832-5
- [64] Jiménez R. Tesis. Optimización de soportes de Colágeno tipo I como un sistema de entrega controlada para un extracto de caléndula (*Calendula officinalis*). 2013.
- [65] Suesca E. Tesis. Optimización de la obtención de soportes de colágeno y estudio del efecto de su microestructura en el desarrollo de mucosa oral artificial. 2013.
- [66] Morton RS, Dongari-Bagtzoglou AI. Cyclooxygenase-2 is upregulated in inflamed gingival tissues. *Journal of periodontology* 2001;72:461-9.
- [67] Onuki Y, Bhardwaj U, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. *Journal of diabetes science and technology* 2008;2:1003-15.
- [68] Ratner BD. The biocompatibility manifesto: biocompatibility for the twenty-first century. *Journal of cardiovascular translational research* 2011;4:523-7.
- [69] Fonseca YM, Catini CD, Vicentini FT, Nomizo A, Gerlach RF, Fonseca MJ. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *Journal of ethnopharmacology* 2010;127:596-601.
- [70] Matysik G, Wojciak-Kosior M, Paduch R. The influence of *Calendula officinalis* flos extracts on cell cultures, and the chromatographic analysis of extracts. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2005;38:285-92.

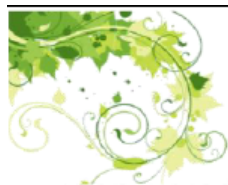
- [71] Ekwall B, Silano V, Paganuzzi A, Zucco F. Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures. Chapter 7, 1990:78-9.
- [72] Yannas IV. Tissue and Organ Regeneration in Adults. Three Modes of Defect Closure in Organs. 2001:70-4.
- [73] Butler CE, Yannas IV, Compton CC, Correia CA, Orgill DP. Comparison of cultured and uncultured keratinocytes seeded into a collagen-GAG matrix for skin replacements. *Br J Plast Surg* 1999;52:127-32.
- [74] Verhaegen PD, Res EM, van Engelen A, Middelkoop E, van Zuijlen PP. A reliable, non-invasive measurement tool for anisotropy in normal skin and scar tissue. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin* 2010;16:325-31.
- [75] Yannas IV. Tissue and Organ Regeneration in Adults. 2001:118.
- [76] Chuang TH, Stabler C, Simionescu A, Simionescu DT. Polyphenol-stabilized tubular elastin scaffolds for tissue engineered vascular grafts. *Tissue engineering Part A* 2009;15:2837-51.
- [77] Frazier APaRA. Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology* 2004;15:186-90.
- [78] Wauters P, Eeckhout Y, Vaes G. Oxidation products are responsible for the resistance to the action of collagenase conferred on collagen by (+)-catechin. *Biochemical pharmacology* 1986;35:2971-3.
- [79] Madhan B, Subramanian V, Rao JR, Nair BU, Ramasami T. Stabilization of collagen using plant polyphenol: role of catechin. *International journal of biological macromolecules* 2005;37:47-53.
- [80] Madhan B, Krishnamoorthy G, Rao JR, Nair BU. Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *International journal of biological macromolecules* 2007;41:16-22.
- [81] Scutt A, Meghji S, Canniff JP, Harvey W. Stabilisation of collagen by betel nut polyphenols as a mechanism in oral submucous fibrosis. *Experientia* 1987;43:391-3.

Anexo 1. Ficha técnica extracto comercial hidroglicólico de caléndula

Extractos naturales

FICHA TÉCNICA**EXTRACTO HIDROGLICÓLICO CALÉNDULA**

- 1. NOMBRE INCI:** Calendula Officinalis Flower Extract
- 2. NOMBRE INCI EXTRACTO OLEOSO DE FLOR DE CALENDULA:** Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil (and) *Calendula officinalis* Flower Extract.
- 3. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA:** *Calendula officinalis* L. Familia: Compositae
- 4. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:** Pequeña planta herbácea anual, con tallos robustos y angulosos, con hojas sésiles. Las inflorescencias son gruesos capítulos (3 – 8 cm) rodeados por dos filas de brácteas vellosas. Las flores centrales tubulosas y hermafroditas son generalmente de un color amarillo anaranjado más intenso que el de las flores periféricas femeninas que poseen una lígula tridentada. El fruto es un aquenio curvado, con su cara convexa espinosa y áspera. El ensayo de la droga, provista de la flor abierta despegada del receptáculo, abarca principalmente una valoración de flavonoides (contenido mínimo 0.4%).
- 5. HÁBITAT:** Nativa de Egipto, sub-espontánea en Europa y adaptada, como medicinal y ornamental, en América. Requiere suelos ricos en humus y es poco exigente en nutrientes.
- 6. COMPOSICIÓN QUÍMICA:** La composición de la droga es bien conocida: flavonoides (0.3 – 1.5% de oligosacáridos en C-3 del isorramnetol y del quercetol), carotenos (licopeno) y xantofilas, aceite esencial (2 – 3 mL/Kg) con derivados sesquiterpénicos oxigenados (cadinoles) y polisacáridos. Los compuestos triterpénicos son especialmente abundantes: derivados mono-, di- y trihidroxilados, libres y esterificados, del lup-20(29)-eno, del olean-12(13)-eno, del tarax-20(30)-eno, del tarax 20(21)-eno [=Ψ], del urs-12(13)-eno: α- y β-amirina, amidiol, faradiol, ursadiol, calenduladiol, heliantrioles. Saponósidos A – D, D2 y F (derivados del ácido oleanólico, el cual se considera que aporta la mayor actividad a nivel cutáneo), el contenido oscila entre un 2 – 10% en función de la variedad y de la época de recolección.
- 7. PARTE USADA:** se emplean las flores.



Extractos naturales

8. ESPECIFICACIONES DE CALIDAD:

ANÁLISIS	PRUEBA	ESPECIFICACIÓN EXTRACTO HIDROGLICOLICO	ESPECIFICACIÓN EXTRACTO OLEOSO DE FLOR DE CALENDULA	MÉTODO
ORGANOLÉPTICO	Aspecto	Líquido homogéneo, libre de partículas extrañas.	Líquido translúcido homogéneo	Organoléptico
	Color	Café oscuro	Amarillo	Organoléptico
	Olor	Ligero característico	Ligero característico	Organoléptico
FISICOQUÍMICO	Densidad (g/mL)	1,024 – 1,034	0.895-0.935	USP
	Índice de Refracción	1,370 – 1,390	1.4650-1.4850	USP
	pH directo	5,0 – 6,0	N-A.	USP
	Solubilidad en Agua (1/10)	Soluble	Insoluble	USP
	Solubilidad en Alcohol (1/10)	Soluble	Insoluble	USP
	Solubilidad en Aceite Mineral (1/10)	Insoluble	Soluble	USP
MICROBIOLÓGICO	Mesófilos	< 100 UFC/mL	< 100 UFC/mL	PETRIFILM 3M
	Hongos y Levaduras	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	PETRIFILM 3M
	Patógenos	Ausentes	Ausentes	PETRIFILM 3M

9. ACCIÓN DERMATOCOSMÉTICA:

- **Propiedades antibacterianas:** Tanto el extracto etanólico al 80%, obtenido a partir de la droga desecada, como la tintura madre homeopática poseen propiedades antibacterianas *in vitro*.
- **Propiedades antiinflamatorias:** Investigadores Rusos han encontrado un efecto antiinflamatorio puesto de manifiesto sobre diversos modelos animales, incluyendo conjuntivitis crónica.
- **Propiedades cicatrizantes:** Estudios han demostrado que en cremas a una concentración del 5% es marcadamente estimulante de la epitelización, por el incremento en glicoproteínas, nucleoproteína y metabolismo de colágeno.
- **Propiedades antipruriginosas:** afecciones dermatológicas, como trófico protector en el tratamiento de grietas, excoriaciones, cortaduras y contra las picaduras de insectos, contra las quemaduras de sol, quemaduras superficiales y poco extensas, eritemas en los glúteos.



Extractos naturales

- **Antálgico:** En afecciones de la cavidad bucal y/o faríngea.

10. OTRAS PROPIEDADES MEDICINALES

- **Úlceras duodenales:** Estudios reportados en Polonia y Bulgaria, demostraron que el extracto de flores de caléndula puede utilizarse en el tratamiento gastroduodenitis y periodontopatías.
- En dismenorrea
- Repelente de insectos

11. CONTRAINDICACIONES: Sensibilidad a especies de la familia de las Asteráceas. No se recomienda su uso durante el embarazo, por haberse descrito acción uterotónica. La planta fresca puede producir dermatitis de contacto.

12. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO: Mantener almacenado en ambientes frescos y secos, temperatura máxima de 25°C, humedad relativa entre 65% - 75% y protegido de la luz directa.

13. PRESENTACIONES: envases plásticos de polietileno blanco por 1.0 Kg y por 4.0 Kg.

14. DOSIS: en emulsiones y líquidos, puede ser usado entre el 1.0% y 5.0%.

BIBLIOGRAFÍA:

1. British Herbal Medicine Association. British Herbal Pharmacopoeia. British Herbal Medicine Association, 1983. p. 44, 45.
2. Bruneton, J. "Farmacognosia: Fitoquímica Plantas Medicinales", Editorial Acribia, segunda edición, Zaragoza, 2001, p. 697-699.
3. Quintero P., Restrepo De Fraume, Mérida. "Plantas Medicinales: Colección Guías Prácticas de Biodiversidad", Editorial Triunfo, volumen 1, 2002, p. 11.
4. B. Vanaclocha y S. Cañigüeral, "Fitoterapia. Vademécum de prescripción", MASSON, Barcelona, 2003, p. 156-157.
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO monographs on selected medicinal plants. [En línea], URL: <http://whqlibdoc.who.int/publications/1999/9241545178.pdf>, Revisado Enero 2010.
6. Dermarderosian A., Beautler J., "The Review of Natural Products", Facts & comparisons, Segunda Edición, Estados Unidos, 2002.